

Камкин А.Г., Киселева И.С.

Атлас по физиологии

Том 1

<http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970424186.html>

408 с.: ил. ISBN 978-5-9704-2418-6.

Год издания 2013

Оглавление

Список аббревиатур	3
От авторов	4
Глава 1. Общая физиология возбудимых тканей	6
Глава 2. Вторичные мессенджеры	161
Глава 3. Синапсы	187
Глава 4. Физиология мышц	236
Глава 5. Нервная система.....	286

Список аббревиатур

АДФ - аденозиндифосфат
АКТГ - адренокортикотропный гормон
АМФ - аденозинмонофосфат
АТФ - аденозинтрифосфат
АЦХ - ацетилхолин
ВПСП - возбуждающий постсинаптический потенциал
ВПСТ - возбуждающий постсинаптический ток
ГАМК - γ -аминомасляная кислота
ГДФ - гуанозиндифосфат
ГТФ - гуанозинтрифосфат
ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛГ - лютеинизирующий гормон
мАЦХ - мускариновый ацетилхолиновый (рецептор или синапс)
МСК - механосенситивные ионные каналы
нАЦХ - никотиновый ацетилхолиновый (рецептор или синапс)
ПКА - протеинкиназа А
ПКС - протеинкиназа С
PKG - протеинкиназа G
РНК - рибонуклеиновая кислота
СПР - саркоплазматический ретикулум
ТПСП - тормозной постсинаптический потенциал
ТТХ - тетродотоксин
ТЭА - тетраэтиламмоний
ФСГ - фолликулстимулирующий гормон
цАМФ - циклический АМФ
цГМФ - циклический ГМФ
ЦНС - центральная нервная система
ЭПР - эндоплазматический ретикулум
АС (*aconitine*) - аконитин
ANP (*Atrial Natriuretic Peptide*) - предсердный натрийуретический пептид
АМРА - α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовая кислота
АТХ - токсины морских анемонов ВТХ (*batrachotoxin*) - батрахотоксин CaM - специфический кальмодулин CBP (*CREB-binding protein*) - CREB-связывающий протеин

CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) - разновидность хлорного канала

CRE (*cAMP response element*) - участок ДНК, взаимодействующий с CREB CREB - белок, связывающийся с CRE

CTX (*ciguatoxin*) - цигуатоксин

DAG - диацилглицерол

DPPX - дипептидил аминопептидаза-подобный протеин

GAP - ГТФаза-активирующие белки

GNRF - гуаниннуклеотидобменный протеин GNRP - гуанин-нуклеотид-освобождающие белки

GRB2 - growth factor receptor-bound protein-2 GTX (*grayanotoxin*) - граянотоксин IP₃ - инозитол-1,4,5-трифосфат JAK - Janus тирозин-протеинкиназы LTD (*long-term depression*) - долговременная депрессия

Список аббревиатур

MAP - митоген-активирующий протеин

MAPK - каскад MAP-киназы

MAPKK (MEK) - киназа MAP-киназы

NGF - фактор роста нервов

NMDA - N-метил-D-аспартат

PP1 (*phosphoprotein phosphatase 1*) - фосфопротеинфосфатаза 1

PbTx (*brevetoxin*) - бреветоксины

RTK - тирозин-протеинкиназа

SAC (*stretch-activated channels*) - каналы, активирующиеся при растяжении клетки

STAT - преобразователи сигнала и активаторов транскрипции

STX (*saxitoxin*) - сакситоксин

TGF - фактор роста опухоли

VER (*veratridine*) – вератридин

От авторов

Предлагаемый вашему вниманию «Атлас по физиологии» представляет собой книгу, в рисунках и короткой текстовой части, в которой даны представления не только о функциях организма, но и продемонстрированы их механизмы на органном, тканевом, клеточном, мембранном и молекулярном уровнях, изложенные на основе представлений, сложившихся в международной учебной и научной литературе на период 2009- 2010 гг. Столь глубокое описание физиологии связано с тем, что и сама эта наука, и ее педагогические аспекты вышли на качественно иной уровень, поскольку предельно расширились и углубились наши представления в области молекулярной биологии, биофизики, генетики. Все это сказалось и на представлениях о физиологии организма. Принципиальный прогресс в этих областях науки позволил определить совершенно новые подходы к лечению тех или иных заболеваний и вывести на качественно новый уровень принципы создания фармакологических препаратов. Поэтому в настоящее время невозможно проводить научные исследования или осуществлять квалифицированное лечение пациентов без знания принципиальных механизмов, лежащих в основе функций

организма, а следовательно, без глубокого знания физиологии как науки. Степень интенсивности развития физиологии можно проследить, взяв в качестве критерия объем основных международных учебников по этой дисциплине, предназначенных для студентов медиков и биологов. Если еще 5 лет тому назад базовые учебники имели объем в пределах 1000 страниц, то в настоящее время объемы учебников достигают 2000 страниц. Это связано с введением в программы обучения студентов большого количества совершенно новых представлений, без которых невозможно представить себе врача XXI в. Все это ставит перед отечественной Университетской школой по физиологии принципиально новые задачи, связанные как с теоретической подготовкой студентов медиков и биологов, так и с привитием им новейших практических навыков. В последние годы в Европе и США произошло углубление программы по физиологии и усиление подготовки студентов медиков и биологов. Планируемая Президентом и Правительством РФ усиленная подготовка студентов высших учебных заведений определяет в виде приоритетной проблемы учебно-методическое обеспечение процесса преподавания.

От авторов

Образовавшееся в последние десятилетия теоретическое, экспериментальное и информационное отставание от европейской Университетской школы по физиологии и университетского образования в этой области в США должно быть устранено в России ближайшее время. К сожалению, эта ситуация сложилась именно тогда, когда физиология, лежащая в основе всех представлений о человеке, в основе всей нашей медицины, достигла небывалого расцвета за счет внедрения в нее знаний, полученных методами молекулярной биологии, биофизики, генетики. Начало позитивных изменений в учебно-методическом обеспечении учебного процесса на кафедрах физиологии уже положено: вышло в свет уже несколько учебных изданий по физиологии. Наконец, издательство «ГЭОТАР-Медиа» выпустило «Атлас по физиологии», предлагаемый вашему вниманию. Таким образом, значительное информационное отставание вузовской физиологии в России уже частично компенсировано созданием учебников международного уровня. В основе «Атласа по физиологии», который существенно дополняет имеющиеся издания, лежит совершенно новый принцип. Обычно атласы по тем или иным дисциплинам представляют собой иллюстративный материал с короткими подрисовочными подписями. В настоящей книге рисунки, наглядно демонстрирующие механизмы тех или иных функций организма, сопровождаются их описанием. Содержание «Атласа по физиологии» полностью соответствует программам по физиологии, принятым в РФ. Два тома атласа включают 10 основных разделов по физиологии. Это общая физиология возбудимых тканей, вторичные мессенджеры, физиология синапсов, физиология мышц, физиология нервной системы, сердечно-сосудистая система, физиология дыхания, кровь, выделительная система и физиология пищеварения.

От авторов

Мы надеемся, что «Атлас по физиологии» будет полезен широкому кругу читателей, имеющих отношение к медико-биологической науке, поскольку книга вносит определенное понимание во многие вопросы. Книга, несомненно, будет полезна не только студентам университетов, изучающим физиологию, но и научным сотрудникам, а также преподавателям биологических и медицинских факультетов университетов России. Книга, как мы надеемся, поможет и клиницистам, занимающимся научной работой, базирующейся на функциях клеток, тканей, органов и организма в целом. «Атлас по физиологии» может служить учебным пособием для студентов медицинских и биологических факультетов университетов, обучающихся по специальности «физиология», а также для ординаторов, аспирантов и молодых специалистов, желающих повысить свою квалификацию.

Глава 1. Общая физиология возбудимых тканей

Липиды

Липиды, широко представленные в клетках организма, это молекулы, состоящие преимущественно из атомов углерода и водорода. Поскольку эти атомы связаны нейтральными ковалентными неполярными связями, липиды неполярны и имеют очень низкую растворимость в воде, что является характерным свойством этого класса органических молекул. Основные подклассы липидов - жирные кислоты, нейтральные жиры (иначе, ацилглицерины или глицериды), стероиды. Наиболее распространенные липиды мембран - это глицеринзамещенные и сфингозинзамещенные липиды, а также гликолипиды и представители стероидов - стерины.

Жирные кислоты

Молекулы жирных кислот - длинные углеводородные цепи с концевой карбоксильной группой. Типичный пример жирных кислот представлен на рис. 1-1, А, Б.

Вследствие того, что жирные кислоты в организме синтезируются путем соединения двухуглеродных фрагментов, большинство жирных кислот имеет четное число углеродных атомов, от 14 до 22.

Если все атомы углерода в жирных кислотах связаны одинарными ковалентными связями, то такая жирная кислота называется насыщенной жирной кислотой. Некоторые жирные кислоты содержат одну или больше двойных связей, и тогда они называются ненасыщенными. Если у жирной кислоты имеется одна двойная связь, то она называется мононенасыщенной кислотой. Когда таких связей более одной, то говорят о полиненасыщенной жирной кислоте.

Насыщенные и ненасыщенные жирные кислоты различаются по своей структурной конфигурации. В насыщенных жирных кислотах углеводородный хвост может принимать множество конформаций вследствие свободы вращения вокруг каждой одинарной связи (рис. 1-1, В), однако наиболее вероятна конфигурация вытянутой формы, как энергетически наиболее выгодная.

В ненасыщенных жирных кислотах невозможно вращение вокруг двойной связи, и это обуславливает жесткий изгиб углеводородной цепи (рис. 1-1, Г, Д). В ненасыщенных жирных кислотах *цис*-конфигурация двойной связи создает изгиб алифатической цепи под углом примерно 30° (рис. 1-1, Г). При *транс*-форме двойной связи конформация углеводородной цепи мало отличается от конформации насыщенной цепи (рис. 1-1, Д).

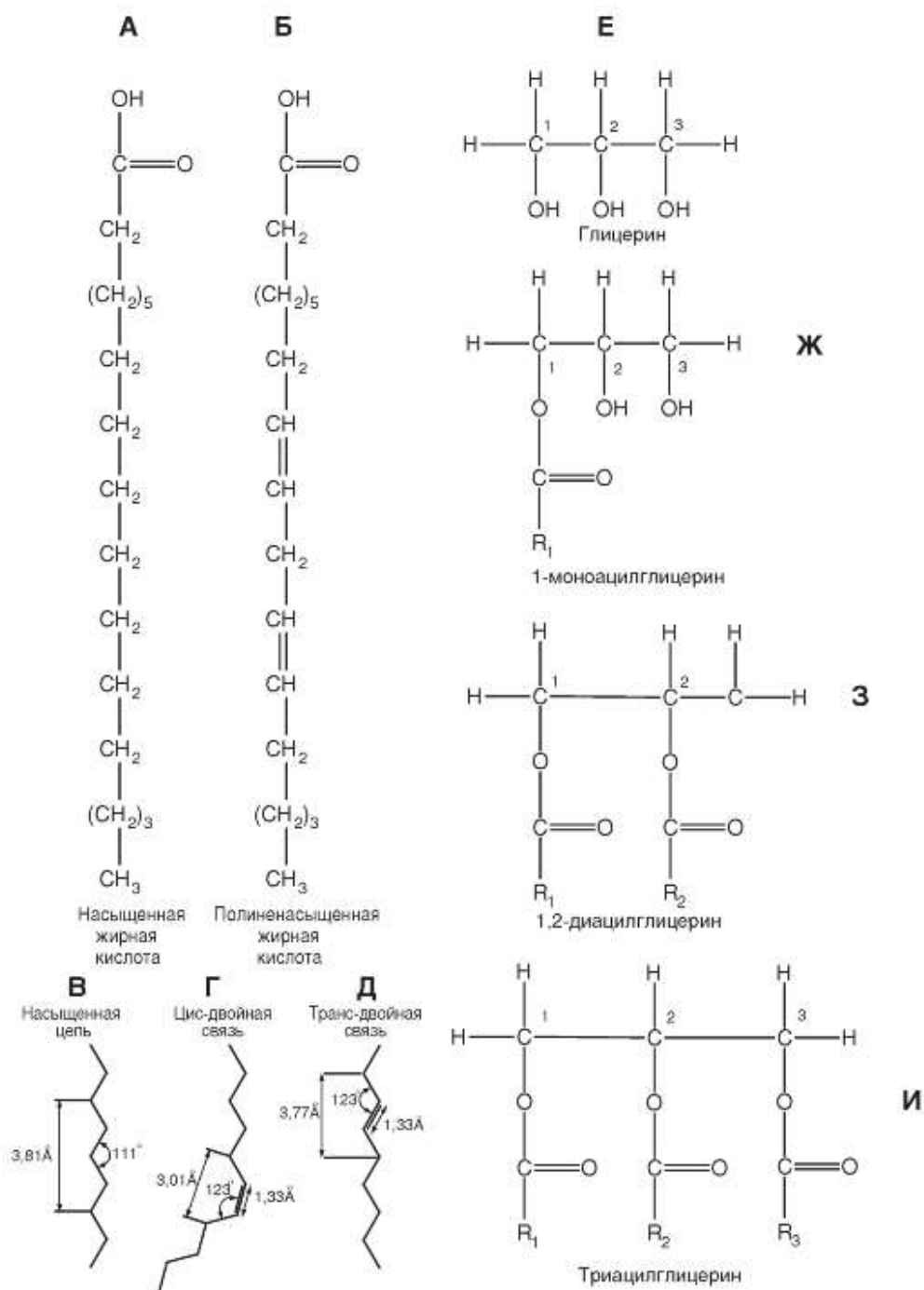
Нейтральные жиры

Глицериновые эфиры жирных кислот называют нейтральными жирами, ацилглицеринами или глицеридами. Они составляют главный компонент жиров, запасаемых в клетках. Структурной основой этих липидов служит замещенный трехатомный спирт глицерин (рис. 1-1, Е).

Если жирными кислотами этерифицированы все три гидроксильные группы глицерина, то такое соединение называется триацилглицерином (рис. 1-1, И). Три жирных кислоты в молекуле триацилглицерина бывают разными, и, таким образом, разные жиры могут включать жирные кислоты с цепочками различной длины и разной степенью насыщенности. Гидролиз триацилглицеридов приводит к освобождению жирных кислот от глицерина, а эти продукты могут расщепляться дальше с выделением энергии, необходимой для функционирования клеток. Триацилглицерины представляют собой основную массу природных нейтральных жиров. Кроме триацилглицеринов встречаются диацилглицерины (рис. 1-1, З) и моноацилглицерины (рис. 1-1, Ж).

Рис. 1-1. Основные соединения, формирующие фосфолипиды.

А и Б - примеры молекул жирных кислот. Молекулы жирных кислот представляют собой длинные углеводородные цепи с концевой карбоксильной группой. Показаны (А) насыщенные (все атомы углерода в жирной кислоте связаны одинарными ковалентными связями) и (Б) полиненасыщенные (содержат одну или больше двойных связей) жирные кислоты. Далее на панелях В, Г, Д показана конфигурация связей жирных кислот: насыщенных (В), ненасыщенных с цис-связью (Г), ненасыщенных с транс-двойной связью (Д). Е - замещенный трехатомный спирт глицерин, структурная основа липидов. (Ж) 1-моноацилглицерин. (З) 1,2-диа- цилглицерин как основа фосфолипида. В положении 2 обычно находится ненасыщенная жирная кислота. (И) Триацилглицерин. Положения жирных кислот отмечены как R_1 R_2 и R_3



Фосфоглицериды

Структурной основой производных глицерина является замещенный трехатомный спирт глицерин. Фосфолипиды мембран представлены преимущественно фосфоглицеридами (рис. 1-2 А, Б). Интересно, что эти соединения в организме встречаются практически только в биологических мембранах. В фосфоглицеридах одна из первичных гидроксильных групп глицерина (группа 3 на рис. 1-2 Б) этерифицирована не жирной, а фосфорной кислотой. Другими словами, основой для их построения является не глицерин, а глицерофосфорная кислота. Если в положении 3 у глицерина находится остаток фосфорной кислоты, то соответствующее соединение называют фосфатидиловой кислотой.

Кроме того, к этому фосфату в ряде случаев присоединяется небольшая полярная ионизированная азотсодержащая молекула, например, как у фосфатидилсерина и фосфатидилхолина (рис. 1-2 Б). Эти группы составляют полярную (гидрофильную) область на одном конце фосфолипида. Две другие гидроксильные группы глицерина (группы 1 и 2) представляют собой остатки жирных кислот и обеспечивают образование неполярного (гидрофобного) участка на противоположном конце молекулы.

Таким образом, молекулы всех фосфоглицеридов содержат полярную голову и два неполярных углеводородных хвоста. Поэтому они называются амфипатическими, т. е. совмещающими свойства и гидрофильности, и гидрофобности. В воде они организуются в кластеры с полярными концами, которые притягивают молекулы воды.

Фосфоглицериды отличаются друг от друга главным образом по X-группе полярной головы молекулы. Наиболее простой тип фосфоглицеридов - фосфатидная кислота, не имеющая X-группы. В клетках она содержится в малом количестве и представляет собой промежуточный продукт в биосинтезе других фосфоглицеридов.

Исходя из изложенной структуры, фосфолипиды обычно обозначаются так, как это представлено на рисунке 1-2 В.

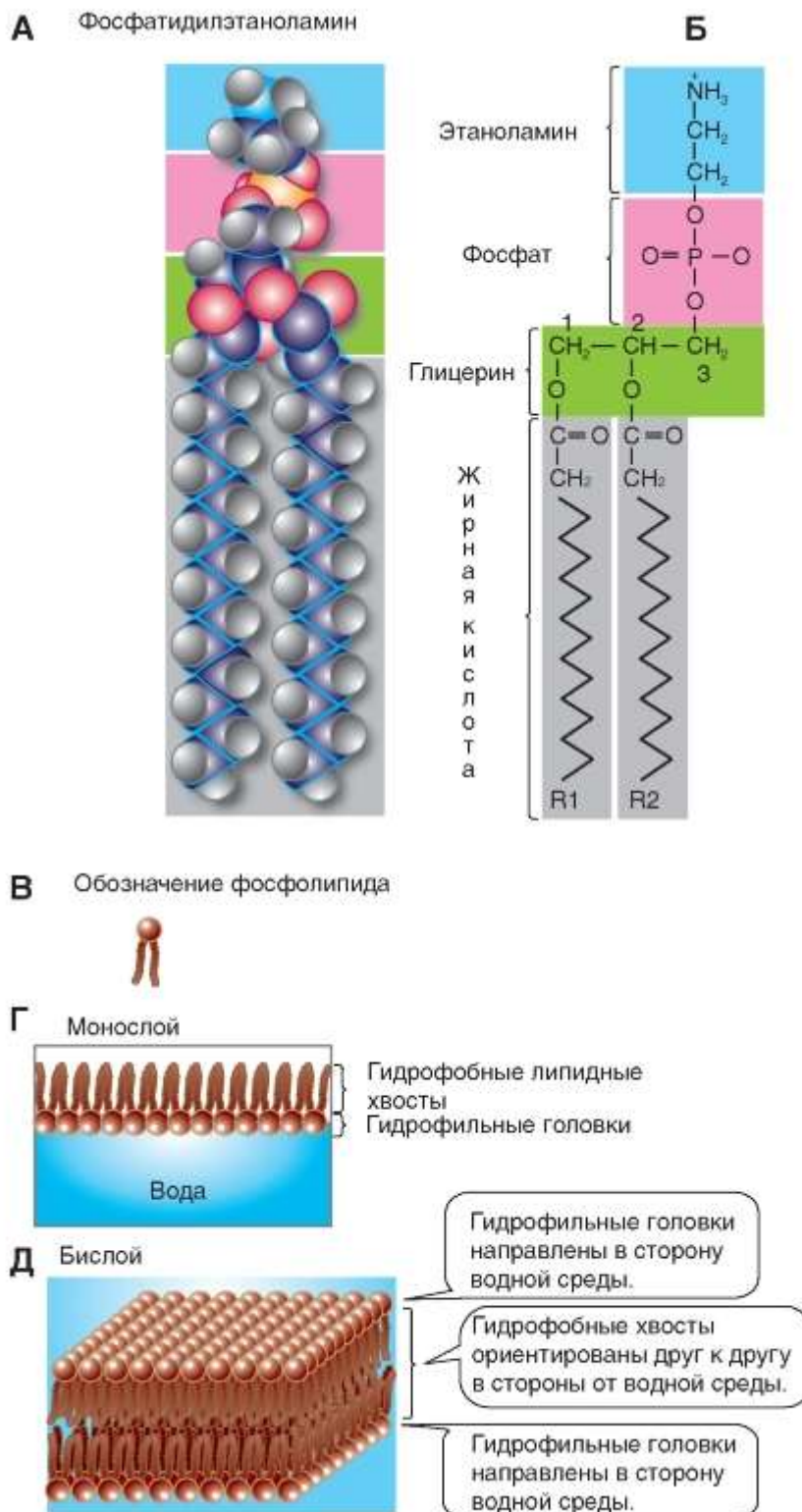
Свойства естественных мембран часто исследуют на их моделях, представляющих собой искусственные фосфолипидные мембраны. Техника получения искусственных липидных мембран была разработана Лэнгмюром в 1917 г. Если на поверхность воды нанести каплю растворенных в каком-либо летучем растворителе фосфолипидов или жирных кислот, то после распределения их молекул по водной поверхности и испарения растворителя образуется мономолекулярная пленка. Как установил Лэнгмюр, при полном насыщении поверхностного слоя адсорбированные молекулы липидов располагаются перпендикулярно к поверхности воды таким образом, что в воду погружается гидрофильная полярная группа, а неполярная углеводородная цепь направлена вертикально вверх. Такой ориентированный слой молекул называют «частоколом Лэнгмюра» (рис. 1-2 Г).

Если стеклянную пластинку опустить в воду, на поверхности которой находится мономолекулярная пленка липидов, то эту пленку можно перенести на поверхность пластинки. При повторных погружениях на пластинке возникают бимолекулярные пленки (рис. 1-2 Д).

Рис. 1-2. Фосфолипиды и принципы формирования мембраны.

А, Б - фосфолипиды мембран преимущественно представлены фосфоглицеридами. В фосфоглицеридах одна из первичных гидроксильных групп глицерина (группа 3) этерифицирована не жирной, а фосфорной кислотой, т. е. их основа не глицерин, а глицерофосфорная кислота. К фосфату присоединяется полярная ионизированная азотсодержащая молекула, как это показано для фосфатидилэтаноламина. Эта группа составляет полярную (гидрофильную) область на одном конце фосфолипида. Две другие

гидроксильные группы глицерина (группы 1 и 2) представляют собой остатки жирных кислот и обеспечивают образование неполярного (гидрофобного) участка. В - обозначение фосфолипида. Г - монослой фосфолипидов на воде. Д - бислой фосфолипидов



Липиды мембран

В наибольшем количестве в организме человека и животных встречаются такие фосфоглицериды (рис. 1-2 А), как фосфатидилэтаноламин. В дополнение, присутствуют

фосфатидилсерин, фосфатидилинозитол и фосфатидилхолин (рис. 1-3 А). Они метаболически связаны друг с другом и содержат в качестве X-группы аминоспирты этаноламин (остаток фосфоэтаноламина) и холин (остаток фосфохолина). В фосфатидилсерине фосфорная кислота этерифицирована гидроксильной группой серина фосфосерина. В фосфатидилинозите X-группой служит шестиуглеродный сахароспирт инозит (остаток фосфорного эфира инозита). В фосфатидилглицерине роль X-группы играет остаток эфира глицерофосфата.

Роль полярной X-группы фосфатидов может играть также молекула сахара. Эти гликофосфоглицериды, или фосфатидилсахара, обнаружены в растениях и микроорганизмах. Их не следует путать с гликолипидами, в молекуле которых тоже находится сахар, но отсутствует фосфорная кислота.

Сфингозинзамещенные липиды

Структурная основа сфингозинзамещенных липидов - аминоспирт сфингозин. Сфинголипиды обнаружены в мембранах растительных и животных клеток; особенно богата ими нервная ткань, в частности мозг. В жировых отложениях сфинголипидов очень немного. При гидролизе сфинголипидов образуются одна молекула жирной кислоты, одна молекула ненасыщенного аминоспирта сфингозина или его насыщенного аналога дигидросфингозина, одна молекула фосфорной кислоты и одна молекула спирта (X-OH). Глицерина сфинголипиды не содержат.

Наиболее распространен сфинголипид сфингомиелин (рис. 1-3 Б), содержащий в качестве X-группы холин. Для сфингомиелина, так же как и для всех других сфинголипидов, характерно то, что одним из его углеводородных хвостов служит длинная алифатическая цепь сфингозина, а другим - этерифицированная жирная кислота. Таким образом, конформации сфинголипидов очень схожи с фосфоглицеридами, так как их молекулы также содержат полярную голову и два неполярных хвоста.

У гликолипидов голову молекулы образуют полярные гидрофильные углеводные группы, чаще всего D-галактоза. Однако в отличие от сфинголипидов, гликолипиды не содержат фосфорной кислоты. К простейшим гликолипидам относятся гликозилдиацилглицерины, обнаруженные в растениях и микроорганизмах. Другая группа, цереброзиды, может быть отнесена как к гликолипидам, так и к сфинголипидам, поскольку эти соединения содержат и сахар, и сфингозин. Поэтому они называются цереброзиды, или гликосфинголипиды. Особенно велико содержание цереброзидов в мембранах нервных клеток, в частности в миелиновой оболочке. Обнаруженные в цереброзидах жирные кислоты необычны, так как содержат 24 атома углерода. Чаще всего встречаются нервоновая, цереброновая и лигноцериновая кислоты. Жирнокислотный эфир сфингозина, не содержащий сахара, называют церамид.

Стероиды

Стероиды резко отличаются по структуре от молекул других подклассов липидов. Стероиды - это производные пергидроциклопентан-фенантренового ядра, содержащего три конденсированных циклогексановых кольца, соединенных друг с другом. К этим структурам может быть присоединено несколько гидроксильных полярных групп, но число их недостаточно, чтобы сделать стероид водорастворимым.

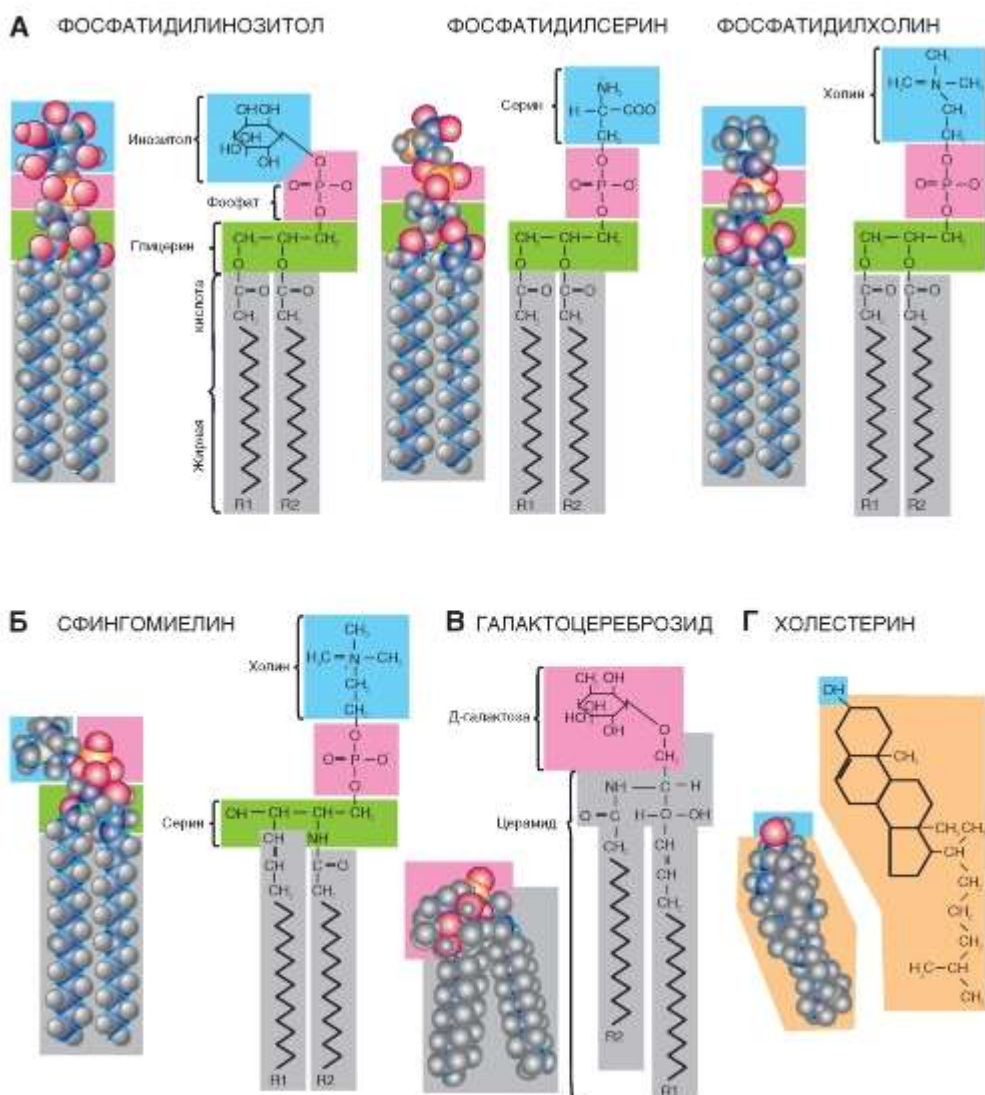
К важным природным стероидам относятся желчные кислоты, мужские и женские половые гормоны, гормоны надпочечников, а также некоторые стероиды с высокой биологической активностью, к которым относятся, в частности, некоторые яды. В клетках эти соединения присутствуют большей частью в следовых количествах, и только представители одного класса стероидов, а именно стерины, составляют исключение. Стеринами клетки очень богаты. Эти соединения содержат спиртовую гидроксильную группу при C-3 и разветвленную алифатическую цепь из восьми или большего числа

атомов углерода при C-17. Они существуют либо в виде свободных спиртов, либо в виде эфиров, у которых гидроксильная группа при C-3 этерифицирована жирной кислотой с длинной цепью.

Примеры стероидов: холестерин (рис. 1-3 Г), кортизол (синтезируется в надпочечниках), женские (эстрогены) и мужские (тестостерон) половые гормоны, секретируемые гонадами. Наиболее распространен холестерин, который содержится в организме как в свободной, так и в этерифицированной форме. Он входит в состав мембран.

Рис. 1-3. Наиболее часто встречающиеся липиды мембран.

А - примеры фосфолипидов; Б - пример сфинголипида; В - пример цереброзида (гликосфинголипида); Г - пример стероидов



Липиды бислоя

В физиологических условиях мембраны обладают динамическими свойствами. Липидный би слой (рис. 1-4 А) по существу представляет собой вязкую жидкость и характеризуется текучестью. Текучесть - это макроскопическая характеристика всего липидного бислоя; ее величина обратна вязкости. Поскольку липидный бислой обладает текучестью, он, следовательно, имеет низкую вязкость. В зависимости от температуры и

химического состава мембраны текучесть может быть высокой или низкой. Текучесть липидного бислоя у теплокровных животных имеет небольшое значение, поскольку температура внутренней среды организма более или менее постоянна, однако у холоднокровных животных этот показатель имеет принципиальное значение, поскольку при понижении температуры вязкость липидного бислоя увеличивается и, следовательно, текучесть уменьшается. Такие изменения динамических свойств мембраны, наряду с рядом других, приводят к тому, что при низких температурах жизнь холоднокровных животных замирает.

Подвижность липидов

Вместе с тем вязкость фосфолипидного бислоя обусловлена двумя видами подвижности на уровне молекул фосфолипидов, которые обладают двумя видами движений: внутримолекулярным и межмолекулярным (рис. 1-4 Б).

К внутримолекулярной подвижности относится подвижность цепей жирных кислот и участков полярной головки, связанная с гибкостью цепей. Гибкость, в свою очередь, связана с возможностью вращения химических группировок относительно одинарной связи. Это так называемая конформационная подвижность.

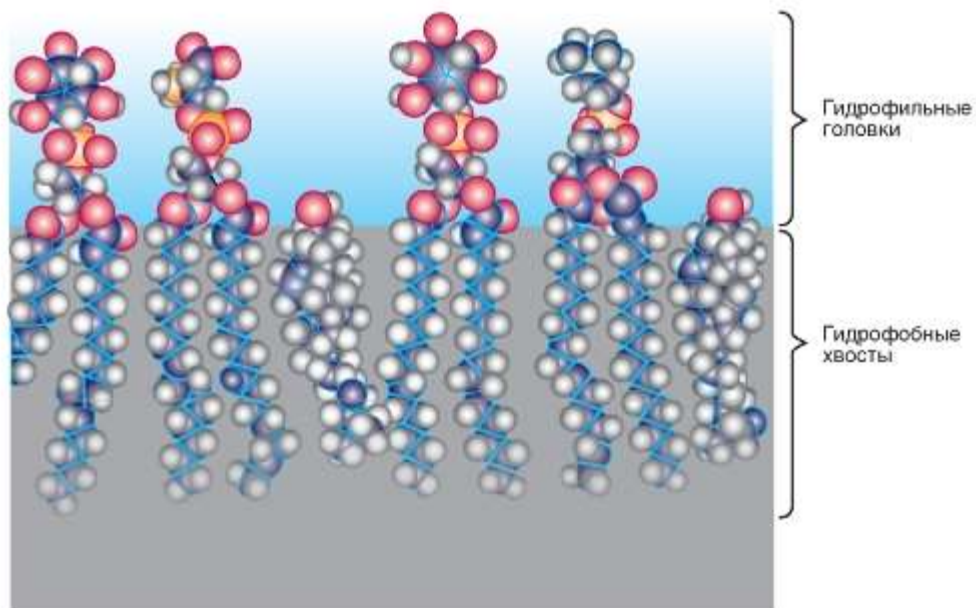
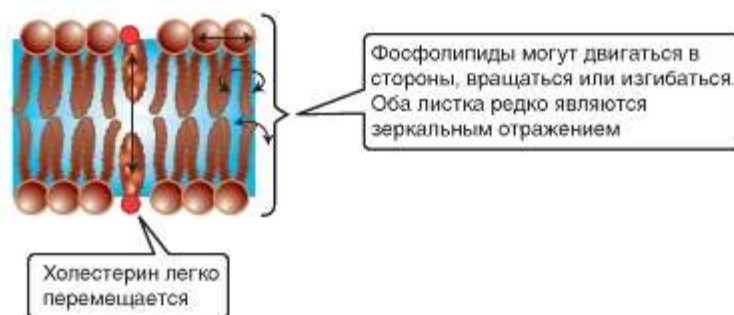
Вращательная диффузия - вращение молекулы вокруг своей продольной (длинной) оси, поскольку в вязкой среде «веретено» в плоскости мембраны легче вращается вокруг продольной оси, чем вокруг поперечной.

Вращение вокруг поперечной (короткой) оси теоретически возможно, но в этом случае центр вращения, присущий фосфолипидам, находится близко к поверхности. Вращение происходит как бы около «шеи» молекулы. В этой области молекулы стиснуты, и движение ограничено. Хвосты в этом случае могут совершать маятникообразные движения, но центр вращения будет находиться вверху. Именно поэтому центральная часть бислоя обладает большей текучестью, чем области цепей жирных кислот, расположенные ближе к полярной голове молекулы фосфолипида.

Межмолекулярное движение представляет собой латеральную диффузию целых фосфолипидных молекул и, по-видимому, происходит путем обмена двух молекул липидов местами.

Рис. 1-4. Формирование липидов в бислое.

А - пример фрагмента одного из листков бислоя, сформированного молекулами (слева направо) фосфатидилинозитолом, фосфатидилсеринем, фосфатидилинозитолом, фосфатидилхолином, холестеринем. Б - варианты подвижности липидов в бислое. Межмолекулярное движение происходит в виде обмена двух молекул липидов местами, а внутримолекулярное движение - в виде вращения молекулы вокруг своей продольной (длинной) оси и вращения вокруг поперечной (короткой) оси. Хвосты могут совершать маятникообразные движения

А**Разнообразие липидов в бислое****Б****Подвижность липидов в пределах бислоя****Белки мембран**

Полипептидная цепь аналогична нитке бус (рис. 1-5 А): каждая «бусинка» представляет собой аминокислоту. Более того, так как аминокислоты могут вращаться вокруг пептидных связей, полипептидная цепочка способна изгибаться и укладываться в виде различных форм, подобно нитке бус, которая может быть закручена во многие конфигурации. Трехмерная форма молекулы известна как ее конформация. Конформации пептидов и белков играют главную роль в их функционировании.

Четыре фактора определяют конформацию полипептидной цепи после того, как образуется последовательность аминокислот:

- водородные связи между участками цепи или между участками цепи и окружающими молекулами воды;
- ионные связи, образующиеся между полярными и ионизированными участками вдоль цепи;
- ван-дер-ваальсовы силы, представляющие собой очень слабые силы притяжения между близко расположенными неполярными (гидрофобными) участками;

- ковалентные связи между боковыми цепями двух аминокислот.

Поскольку пептидные связи расположены вдоль цепи через равные интервалы, то водородные связи между ними имеют тенденцию придавать цепи пространственную организацию, известную как α -спираль. Водородные связи могут также образовываться между пептидными связями, когда выступающие участки полипептидной цепи идут примерно параллельно одна другой, образуя сравнительно прямые структуры типа складчатого слоя, которые известны как β -слой. Однако по разным причинам данные участки полипептидных цепей могут и не образовывать конформации в виде α -спирали или в виде β -слоя. Например, размеры боковых цепей и ионные связи между противоположно заряженными боковыми цепями могут препятствовать образованию повторяющихся водородных связей, необходимых для образования этих структур. Эти неупорядоченные участки, называемые петлями, встречаются в местах, связывающих более регулярные α -спиральные и β -структурные участки.

Ковалентные связи между определенными белковыми цепями могут также искривлять регулярные складчатые слои. Например, боковая цепь аминокислоты цистеина содержит сульфгидрильную группу ($R-SH$), которая может взаимодействовать с сульфгидрильной группой в другой боковой цепи цистеина, образуя дисульфидную связь ($R-S-S-R$), которая связывает две аминокислотные цепи вместе. Такие дисульфидные ковалентные связи образуются между участками полипептидной цепи в противоположность более слабым водородным и ионным связям, которые легче разрушаются. Эти же связи вовлечены и в другие межмолекулярные взаимодействия, описанные ниже.

Большинство белков состоят не из одной, а из нескольких полипептидных цепей, и их называют мультимерными (олигомерными) белками. Те же факторы, которые влияют на конформацию одного полипептида, определяют взаимодействие между полипептидами в олигомерных белках. Таким образом, цепи могут поддерживаться вместе благодаря взаимодействию между разными ионизированными, полярными и неполярными боковыми радикалами цепи, а также за счет образования дисульфидных ковалентных связей между цепями.

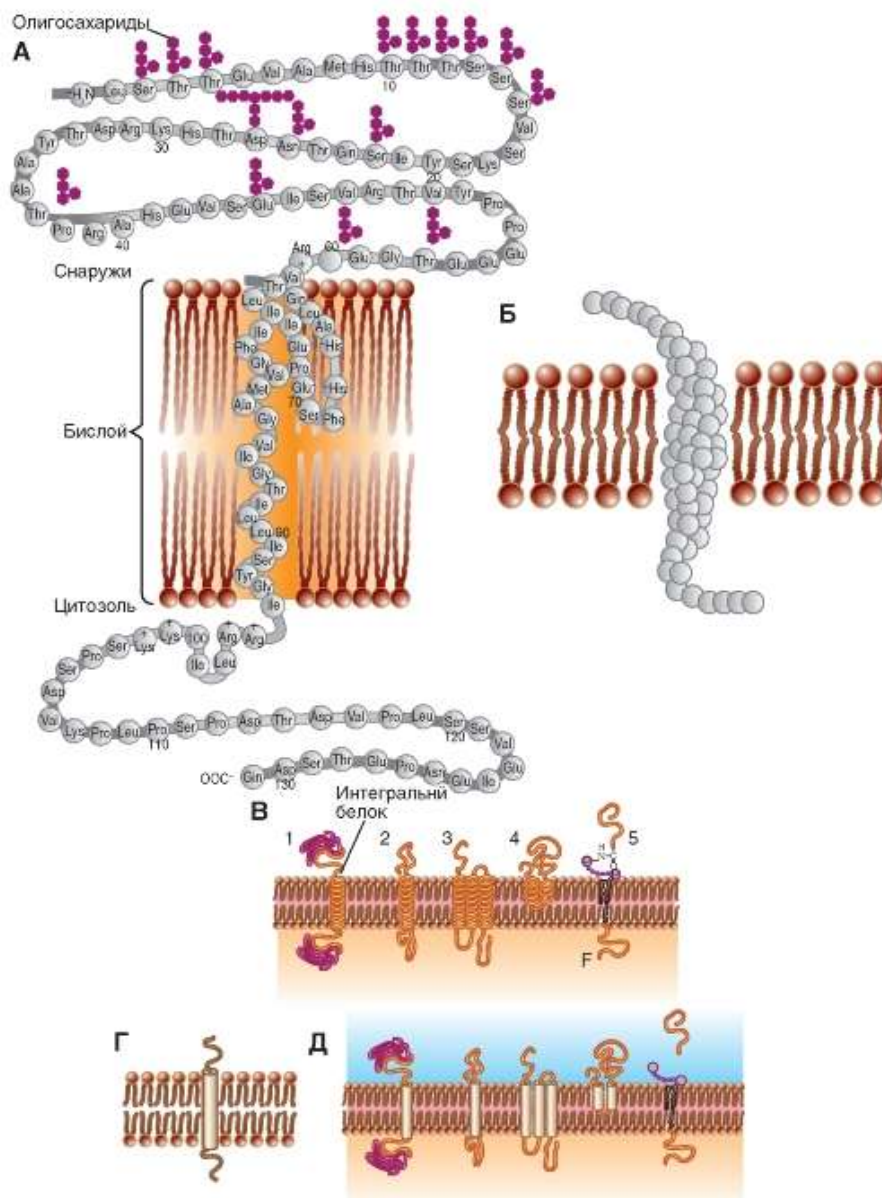
Первичная структура (последовательность аминокислот) подавляющего количества белков известна, но трехмерная организация определена только для очень небольшого числа белков. Вследствие того, что многие факторы могут изменять упаковку полипептидной цепи, в настоящее время невозможно точно предсказать пространственную организацию белка на основе его первичной структуры.

На рис. 1-5 Б и рис. 1-5 В представлены модели интегральных белков, включенных в мембрану.

На рис. 1-5 Г показано стандартное обозначение интегрального белка, а рис. 1-5 Д дублирует рис. 1-5 В, но в виде стандартного обозначения.

Рис. 1-5. Схематическое изображение различных белков, по-разному встроенных в мембрану.

А - принципиальная схема полипептидной молекулы, встроенной в липидный бислой. Известными символами обозначены аминокислоты, входящие в состав белка. Б - модель полипептидной молекулы, встроенной в липидный бислой. Аминокислоты обозначены глобулами. В - модели полипептидных молекул, встроенных в липидный бислой. Трансмембранные фрагменты каждой молекулы обозначены спиралями. Г - основная используемая модель полипептидной молекулы, встроенной в липидный бислой. Трансмембранный фрагмент молекулы обозначен цилиндром. Д - модели полипептидных молекул, встроенных в липидный бислой. Трансмембранные фрагменты каждой молекулы обозначены цилиндрами



Интегральные мембранные белки в модели мембраны

Все мембраны, помимо фосфолипидов, содержат и белки. Хотя Дж. Даниэлли и Х. Давсон, обсуждая способ связывания белка с двойным слоем липидов, использовали термин «мозаичный», они отвергли предположение о том, что пленка растянутого белка покрывает ту или иную сторону мембранного бислоя липидов. Мысль о растянутых молекулах белка, находящихся в конфигурации β -слоя, стала составной частью гипотезы «элементарной мембраны», выдвинутой Дж. Робертсоном. Однако в дальнейшем было показано, что мембранный белок находится преимущественно в виде α -спирали, а не β -слоя. В настоящее время признано, что существуют белки и связанные с обеими сторонами мембраны, и пронизывающие насквозь двойной липидный слой.

В зависимости от метода, применяемого для отделения белков от мембран, мембранные белки причисляют к одной из двух обширных групп. Первая группа - периферические, или внешние, белки, переходящие в надосадочную жидкость при отмывании мембран буферными растворами с различными значениями pH или ионной силы либо растворами, содержащими комплексообразующие вещества, такие, как ЭДТА или ЭГТА. Вторая группа - интегральные, или трансмембранные, белки, сохраняющие

связь с мембранами и после проведения указанных операций; поэтому для их освобождения необходимо сначала разрушить структуру фосфолипидного двойного слоя.

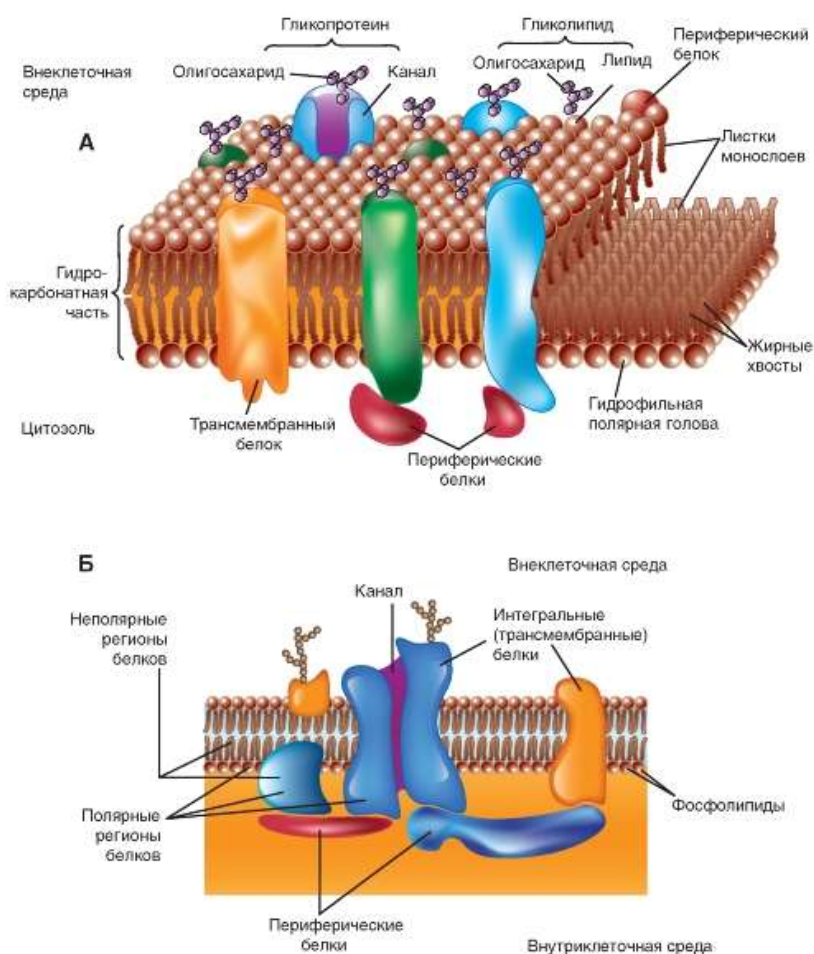
В 1972 г. С. Сингер (S. Singer) и Г. Николсон (G. Nicolson) первыми описали интегральные белки (рис. 1-6 А,Б). В настоящее время показано, что эти белки чрезвычайно разнообразны по своей структуре. Они асимметрично распределены в бислое. Подавляющее большинство интегральных белков многократно пересекают липидный бислой - зигзагообразные белки. Они выполняют множество различных функций. Интегральные белки выступают в роли гидролитических ферментов, рецепторов клеточной поверхности, окислительно-восстановительных компонентов транспортной системы электронов и в качестве специфических белков-переносчиков.

Из гистологических исследований известно, что в гликозилированных интегральных белках область, содержащая углеводы, расположена либо на клеточной поверхности, либо внутри полости эндоплазматического ретикулума или комплекса Гольджи.

Многие интегральные белки содержат в своих полипептидных цепях последовательности гидрофобных аминокислот, однако некоторые связаны с липидным бислоем по иному механизму. Часть интегральных белков ковалентно связана с липидами.

В настоящее время большой интерес исследователей вызывает изучение конформации белков мембран. Многие важные процессы сопровождаются или вызываются изменением способа укладки полипептидной цепи, т. е. изменением конформации белковых молекул в мембранах.

Рис. 1-6. Модель мембраны. Показан липидный бислой со встроенными в него белками, выполняющими разнообразные функции



Транспорт через мембрану

При всем многообразии строения и физикохимических свойств молекул проникающих веществ можно выделить два механизма перемещения веществ через мембрану - посредством простой диффузии, т.е. без помощи специфического переносчика, и при помощи специфических переносчиков. В первом случае выделяют диффузию соединений непосредственно через липидный бислой мембраны (рис. 1-7 А) и ионов через ионные каналы (рис. 1-7 Б). Во втором случае выделяют так называемую облегченную диффузию, первично активный транспорт и, наконец, вторично активный транспорт.

Рассмотрим сначала простую диффузию. Посредством простой диффузии без помощи специального переносчика, во-первых, осуществляется транспорт соединений непосредственно через липидный бислой. В этом случае проникновение веществ в клетку идет путем их растворения в липидах клеточной мембраны, поэтому такой способ присущ водонерастворимым органическим соединениям и газам (например, кислороду и углекислому газу). Во-вторых, вещества перемещаются через ионные каналы клеточной мембраны, соединяющие цитоплазму клеток с внешней средой. Ионный канал - это белковая структура на основе мембранной α -субъединицы, образованная доменами и имеющая вид, подобный пончику с отверстием в середине - порой, через которую движутся ионы. Клетки используют этот путь для транспорта преимущественно ионов Na^+ , Ca^{2+} , K^+ (рис. 1-7 Б). Это пассивный ионный транспорт, который определяется градиентами концентрации и электрического поля (электрохимическим градиентом).

В данном случае понятие «градиент» отличается от его определения в математике или физике. В физико-химических или биологических системах используют термин «по градиенту», когда речь идет о движении от большего электрохимического потенциала к меньшему, а при движении от меньшего электрохимического потенциала к большему применяют термин «против градиента».

Изменение электрохимического потенциала $\Delta\mu$ (без учета химической энергии, или химических потенциалов) можно записать в виде:

$$\Delta\mu = \mu_0 + RT\ln(C_2/C_1) + zF(\phi_2 - \phi_1) \quad (1.1)$$

Это максимальная работа, которую можно совершить при переносе одного моля ионов. В таком случае $RT\ln(C_2/C_1)$ равно работе по концентрированию раствора от C_1 до C_2 , а $zF(\phi_2 - \phi_1)$ равно работе по преодолению сил электрического отталкивания, возникающих при разности потенциалов $(\phi_2 - \phi_1)$ между растворами.

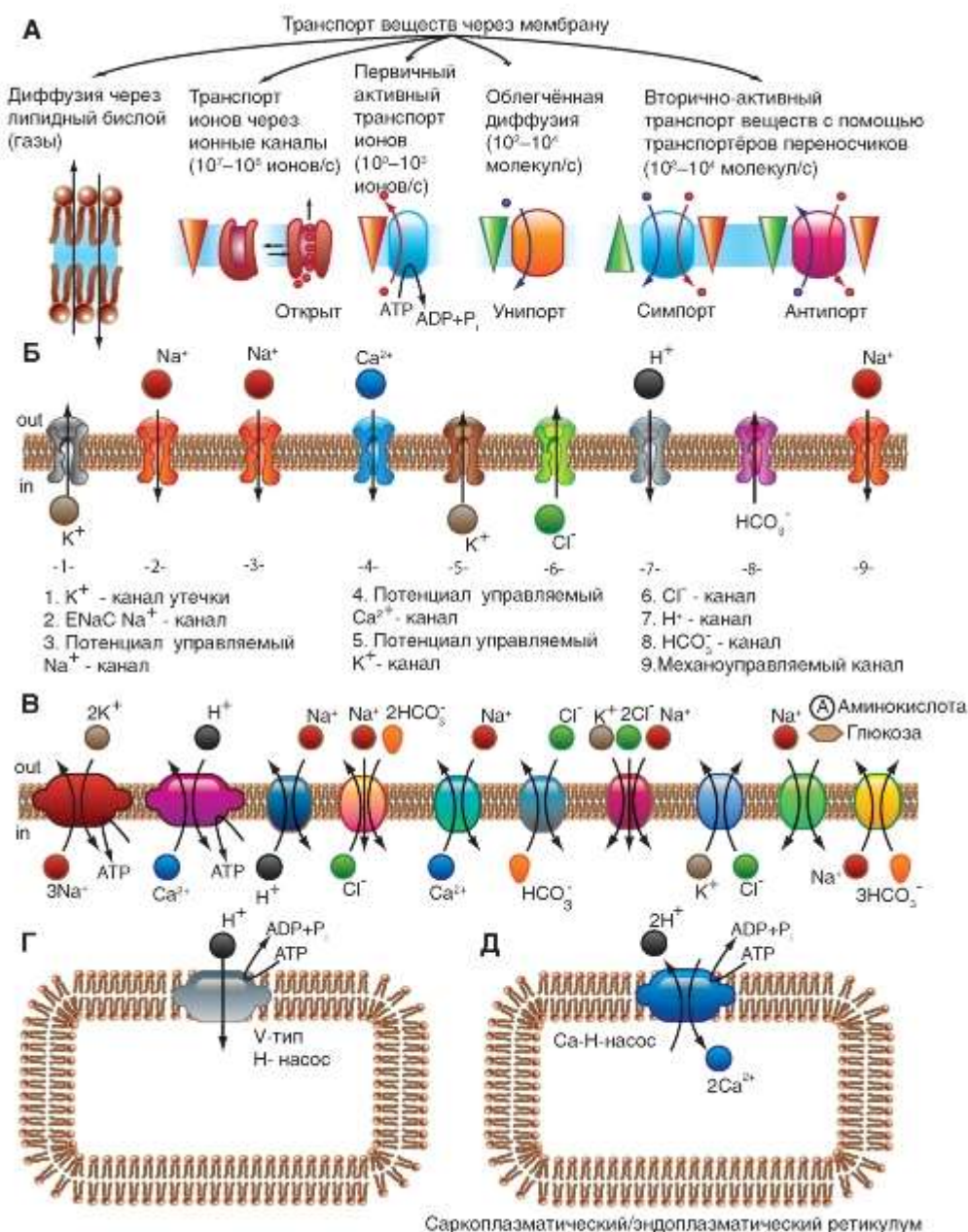
При помощи специфических переносчиков осуществляется энергетически независимая облегченная диффузия ряда соединений (рис. 1-7 В, Г и Д).

Энергетически зависимый первично активный транспорт ионов Na^+ , Ca^{2+} , K^+ и H^+ - это перенос веществ против их электрохимических градиентов с затратой энергии АТФ. Клетки в результате активного переноса ионов способны накапливать их в более высоких, по сравнению с окружающей средой, концентрациях и вопреки их заряду. Многие градиенты, возникающие на клеточной мембране и служащие необходимым условием для пассивного переноса ионов по ионным каналам, появляются именно в результате их активного транспорта. Так, градиенты концентрации K^+ и Na^+ возникают в результате активного переноса этих ионов, т.е. работы специального Na^+/K^+ -насоса. За счет создающейся по обе стороны мембраны разности концентраций осуществляются диффузия этих ионов по градиентам и генерация потенциалов мембраны.

Наконец, вторично активный транспорт ряда ионов и молекул тоже использует энергию, накопленную за счет потребления АТФ и затраченную на создание градиента концентрации (что дает название виду транспорта).

Рис. 1-7. Основные принципы транспорта ионов и некоторых веществ через мембрану и некоторые транспортные системы в клеточной мембране и мембране органелл.

А - продемонстрированы основные пути транспорта веществ через мембрану. Б - показаны различные типы ионных каналов, обеспечивающие транспорт ионов по электрохимическому градиенту. В - насосы, обеспечивающие транспорт ионов против градиента концентрации, обменники и транспортеры. Г и Д - транспортные системы органелл



Na⁺-канал. Планометрическая организация

Прежде всего, рассмотрим модель молекулярной организации потенциалуправляемого Na⁺-канала.

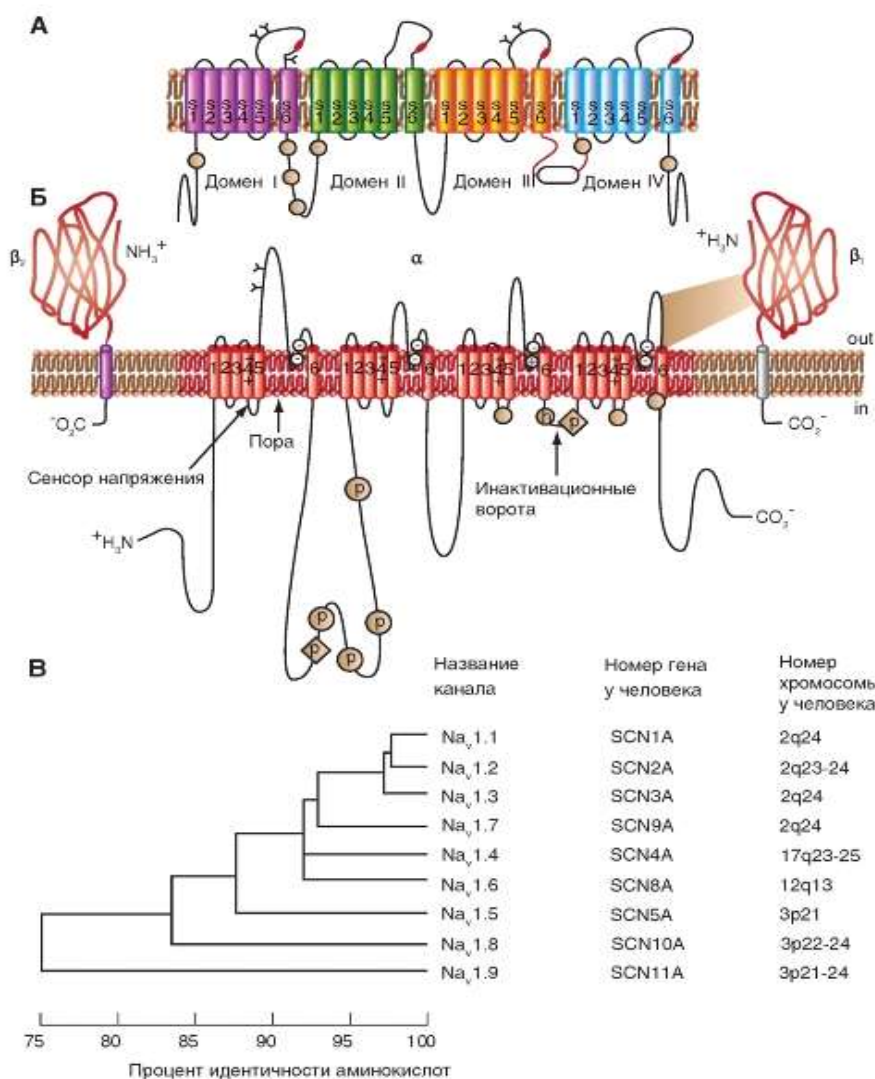
Na⁺-канал состоит из широко разветвленной α -субъединицы, молекулярная масса которой приблизительно равна 260 кДа (рис. 1-8 А). Разветвленная α -субъединица связана с добавочными β -субъединицами (рис. 1-8 Б). Na⁺-каналы в клетках центральной нервной системы взрослых животных содержат β_1 - (или β_3 -) и β_2 -субъединицы, в то время как Na⁺-каналы в скелетных мышцах у взрослых животных имеют только β_1 - субъединицу. Порообразующая α -субъединица достаточна для обеспечения функции, но кинетика и потенциалзависимость воротного механизма канала модифицируется β -субъединицами. У Na⁺-канала α -субъединица организована в 4 гомологичных домена (I-IV), каждый из которых содержит 6 трансмембранных α -спиралей (S1-S6- сегменты), а добавочная петля поры локализована между S5- и S6-сегментами. Петля снаружи ограничивает узкий вход в пору, в то время как S5- и S6-сегменты ограничивают внутренний, более широкий, выход из поры. Сегменты S4 в каждом домене содержат положительно заряженные аминокислотные остатки в каждой третьей позиции, выступающие в качестве воротных зарядов идвигающихся через мембрану для инициирования канальной активности в ответ на деполяризацию мембраны. Короткая внутриклеточная петля, соединяющая гомологичные домены III и IV, выступающая в роли инактивационных ворот, образует складку, внедряющуюся внутрь канальной структуры и блокирующую пору изнутри в течение длительной деполяризации мембраны.

В последние годы для Na⁺-каналов была разработана новая стандартная классификация (рис. 1-8 В), основанная на сходстве между аминокислотными последовательностями каналов. В этой классификации индивидуальный канал представлен в виде химического символа, который показывает главный проходящий ион (Na) с главным физиологическим регулятором канала (потенциалом - «*voltage gate channels*»), и это записывается вместе как Nav. Число после этих символов показывает генное подсемейство (в настоящее время это только Nav1.), а число, следующее за точкой, показывает специфическую канальную изоформу (например, Nav1.1). Это последнее число было предложено для того, чтобы показать порядок, в котором был идентифицирован каждый ген. Перекрещивающиеся варианты каждого члена семейства обозначаются маленькими буквами, следующими за номером (например, Nav1.1a).

Девять изоформ Na⁺-каналов млекопитающих, которые были идентифицированы, функционально более чем на 50% идентичны по своей аминокислотной последовательности в трансмембранных и экстрацеллюлярных доменах, где аминокислотная последовательность одинакова. Этого достаточно для четкого выстраивания в ряд всех Na⁺-каналов.

Рис. 1-8. Планометрическая модель молекулярной организации потенциалуправляемого Na⁺-канала.

А - порообразующая α -субъединица. Основные структуры α -субъединицы показаны как трансмембранные цилиндры, представляющие собой α -спиральные сегменты. Жирные линии демонстрируют цепи полипептида каждой субъединицы с длиной, приблизительно пропорциональной числу остатков аминокислот. α -Субъединица состоит из четырех доменов (DI-DIV), каждый из которых состоит из шести сегментов (S1-S6). Сегмент S4 - предполагаемый сенсор напряжения. Б - полная структура канала, включающая α -субъединицу и β_1 -, β_2 -субъединицы. Внеклеточные участки β_1 -, β_2 -субъединиц показаны как складки. Ψ - участки вероятного гликозилирования; Р - места фосфорилирования протеинкиназой А (круги) и протеинкиназой С (ромбы); h - инактивационная частица в петле инактивационных ворот. В - подобие последовательности аминокислот и филогенетические взаимоотношения α -субъединиц потенциалуправляемых Na⁺-каналов. Показано сравнение аминокислотной идентичности для Na⁺-каналов Nav1.1- Nav1.9. Даны номер гена и номер хромосомы у человека



Na⁺-канал. Объемные модели

Диаметр пор Na⁺-канала очень маленький. Он только несколько больше, чем диаметр ионов, которые проходят через эти каналы, что предотвращает вход в них больших полярных органических молекул.

Трехмерное изображение упаковки четырех доменов порообразующей α -субъединицы потенциалуправляемого Na⁺-канала, каждый из которых содержит 6 пронумерованных трансмембранных сегментов (S1-S6), показано на рис. 1-9 А. Сама пора представлена полым цилиндрическим отверстием в центре упаковки. Связи между сегментами не показаны. Планометрическое изображение среза канала представлено на рис. 1-9 Б. В этом случае трехмерное изображение упаковки четырех доменов порообразующей α -субъединицы потенциалуправляемого Na⁺-канала можно представить так, как это показано на рис. 1-9 В.

На рис. 1-9 Г канал представлен как трансмембранная макромолекула с отверстием, проходящим насквозь через центр. Ионный канал включает в себя несколько важнейших структур и в том числе устье канала, обращенное в сторону, откуда в него поступает ион (в данном случае внешняя сторона мембраны), селективный фильтр, оценивающий вид иона, активационные и инактивационные ворота, которые могут перекрывать канал для прохождения ионов, и, наконец, сенсор напряжения, управляющий работой канала. (Хотя

для многих ионных каналов показано большее количество ворот канала, мы будем обсуждать их работу только с позиций активационных и инактивационных ворот.)

Рис. 1-9. Объемная модель молекулярной организации потенциалуправляемого Na^+ -канала.

А - структура всех четырех доменов. На схеме шесть трансмембранных сегментов каждого домена представлены в виде цилиндров и схематически объединены вместе, как это принято. Связи между сегментами и доменами не показаны. Один домен ионного канала, построенный интегральным мембранным белком, содержащим шесть трансмембранных сегментов (S1, S2, S3, S4, S5 и S6), каждый из которых имеет α -спиральную конфигурацию в пределах мембраны. Б - поперечный срез ионного канала, каждый из четырех доменов которого имеет шесть трансмембранных сегментов. В - модель объемного изображения четырех доменов с порой в середине. Г - физиологическая модель потенциалуправляемого Na^+ -канала

Модель работы Na^+ -канала

Наиболее простая и широко известная схема работы потенциалуправляемого Na^+ -канала показана на рис. 1-10 А. Канал представляет собой трансмембранный белок, находящийся в липидном бислое мембраны, прикрепленный к другим мембранным белкам или элементам внутриклеточного цитоскелета. Когда канал открывается, образуется водная пора, проходящая через мембрану. Устье поры намного шире, чем размер иона, только на небольшом участке в области селективного фильтра оно сужается до атомных размеров, где определяется природа иона. Гидрофильные аминокислоты формируют стенку поры, а гидрофобные аминокислоты связаны с липидным бислоем.

В настоящее время механизм работы ворот канала уже достаточно изучен. Одним из первых его попытался описать Б. Хилле. Согласно его точке зрения, основанной на экспериментах А. Ходжкина и А. Хаксли и собственных работах, в ответ на действие электрического раздражителя, т. е. на изменение трансмембранного потенциала, происходит изменение конформации белка потенциалуправляемого канала. Эти конформационные изменения регулируются электрическим полем внутри мембраны, носят стохастический характер и протекают за время от 30 мкс до 10 мс. Важно, что для открытия и закрытия канала не требуются высокоэнергетические химические соединения. Каналы открываются при одних и закрываются при других трансмембранных потенциалах. Было предположено, что электрическое поле действует на сенсор напряжения, который определяет трансмембранный потенциал. Затем сенсор напряжения должен передать эту информацию на саму канальную молекулу для ее конформационной перестройки и соответствующего изменения частоты открытия и закрытия канала.

В 1992 г. Б. Хилле предположил, что изменения конформации происходят в результате общего перераспределения заряда в макромолекуле, образующей канал, и выражаются в виде открытия или закрытия ворот канала (рис. 1-10 А). Другими словами, возможность открытия и закрытия ворот канала контролируется сенсором напряжения. В случае потенциалуправляемых каналов сенсор должен включать много заряженных групп, которые двигаются под действием электрического поля. Необходимо заметить, что работа сенсора напряжения и ворот канала, показанная на рис. 1-10 А, представляла собой рабочую гипотезу Б. Хилле, высказанную на основании электрофизиологического изучения проводимости канала.

Рассматривая канал с позиций наличия только двух - активационных и инактивационных - ворот, можно представить следующую последовательность событий (рис. 1-10 Б). В ответ на деполяризацию мембраны происходят изменения конформации канальной молекулы: одновременно начинают смещаться активационные и инактивационные ворота, но с разной скоростью и в разных направлениях: активационные

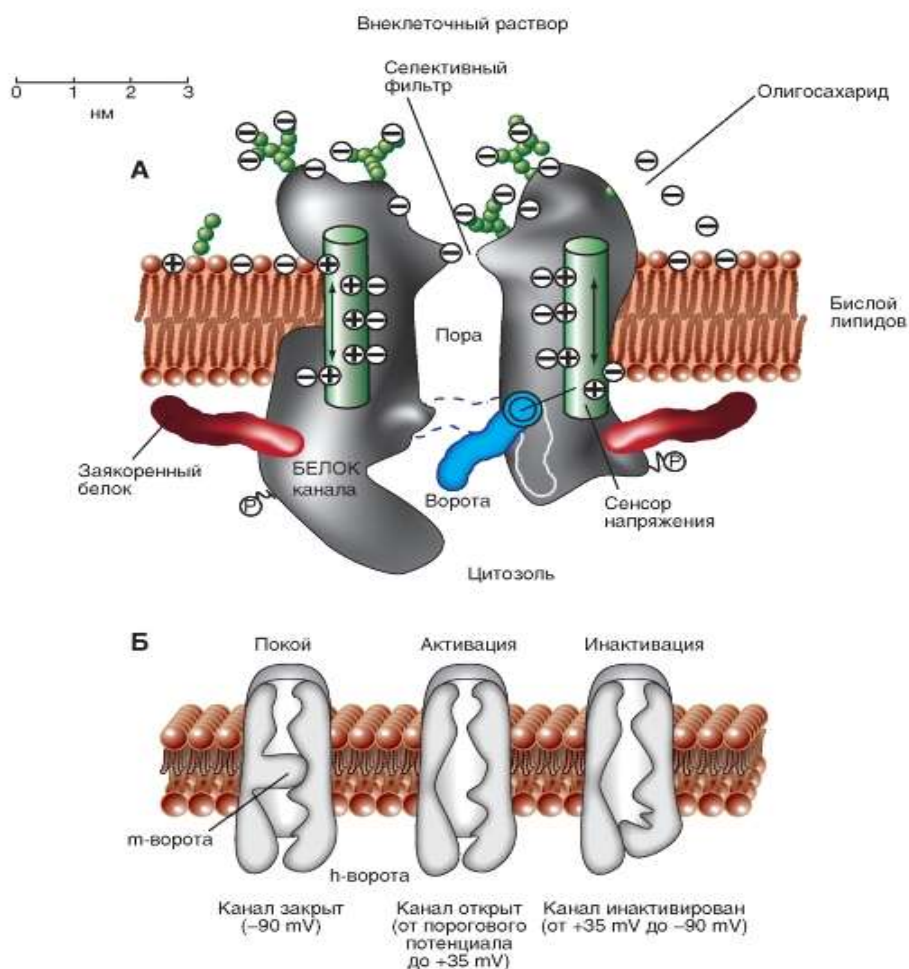
ворота стремятся открыть канал, а инактивационные - закрыть. Скорость смещения частиц, образующих активационные ворота, больше, и это приводит к открытию канала (переход из состояния покоя в состояние активации). В это время через канал проходят ионы натрия. Следующее за этим изменение трансмембранного потенциала приводит к закрытию инактивационных ворот. Это переводит канал из активированного состояния в инактивированное.

Когда канал открывается, ионный поток появляется сразу, а когда закрывается, поток ионов также сразу прекращается. На уровне одиночного канала воротные переходы стохастические; они могут быть описаны только в терминах вероятностей.

Потенциалуправляемый Na^+ -канал может находиться в трех состояниях: состоянии покоя, активации и инактивации, которые представлены в виде модели на рис. 1-10 Б.

Рис. 1-10. Схема работы потенциалуправляемого Na^+ -канала.

А - канал представляет собой трансмембранную макромолекулу с отверстием, проходящим насквозь через центр. Функциональные области ионного канала - селективный фильтр, ворота и сенсор напряжения - обнаружены в ходе электрофизиологических экспериментов. Б - модель работы потенциалуправляемого Na^+ -канала, имеющего активационные (или m-ворота) и инактивационные (или h-ворота). В состоянии покоя канал закрыт вследствие закрытия активационных ворот. Смещение мембранного потенциала в положительную область (до порогового значения) вызывает открытие активационных ворот. При достижении максимального для конкретной клетки потенциала канал инактивируется, т.е. происходит закрытие инактивационных ворот



Ca²⁺-канал. Планометрическая организация

Потенциалуправляемые Ca²⁺-каналы позволяют ионам Ca²⁺ входить в клетки, когда мембрана деполяризована. Роль Ca²⁺-каналов особенно значительна для взаимосвязи электрических потенциалов, возникающих на мембране клетки, с физиологическими процессами, происходящими внутри клетки. Повышение цитозольной концентрации Ca²⁺ вызывает различные клеточные реакции, например сокращение, секрецию, выброс медиатора, процессы транскрипции.

Ca²⁺-каналы представляют собой комплекс белков, образованный из α_1 -субъединицы и вспомогательных $\alpha_2\delta$ -, β - и γ -субъединиц. Субъединица α_1 формирует проводящую пору, она содержит сенсор напряжения и аппарат ворот канала. Петля между трансмембранными сегментами S5 и S6 в каждом домене определяет селективность и проводимость канала. Селективный фильтр Ca²⁺-канала должен узнать ион Ca²⁺ уже на входе в канал. Эти события достаточно редки по сравнению с входами ионов Na⁺, количество которых во внеклеточной среде примерно в 100 раз больше. Хотя ионы Ca²⁺ и Na⁺ имеют идентичный диаметр (2 Å), канал может выбирать Ca²⁺ в большей степени, чем Na⁺, в соотношении 1000:1. Никакое сито не может так эффективно дифференцировать ионы идентичного размера. Скорее всего, пора содержит специфическое место, которое способно связывать Ca²⁺ при его очень низких концентрациях в растворе (10⁻⁶ М), а все другие физиологические ионы связывает в намного более высоких концентрациях.

Ca²⁺-каналы были классифицированы на основе двух принципов:

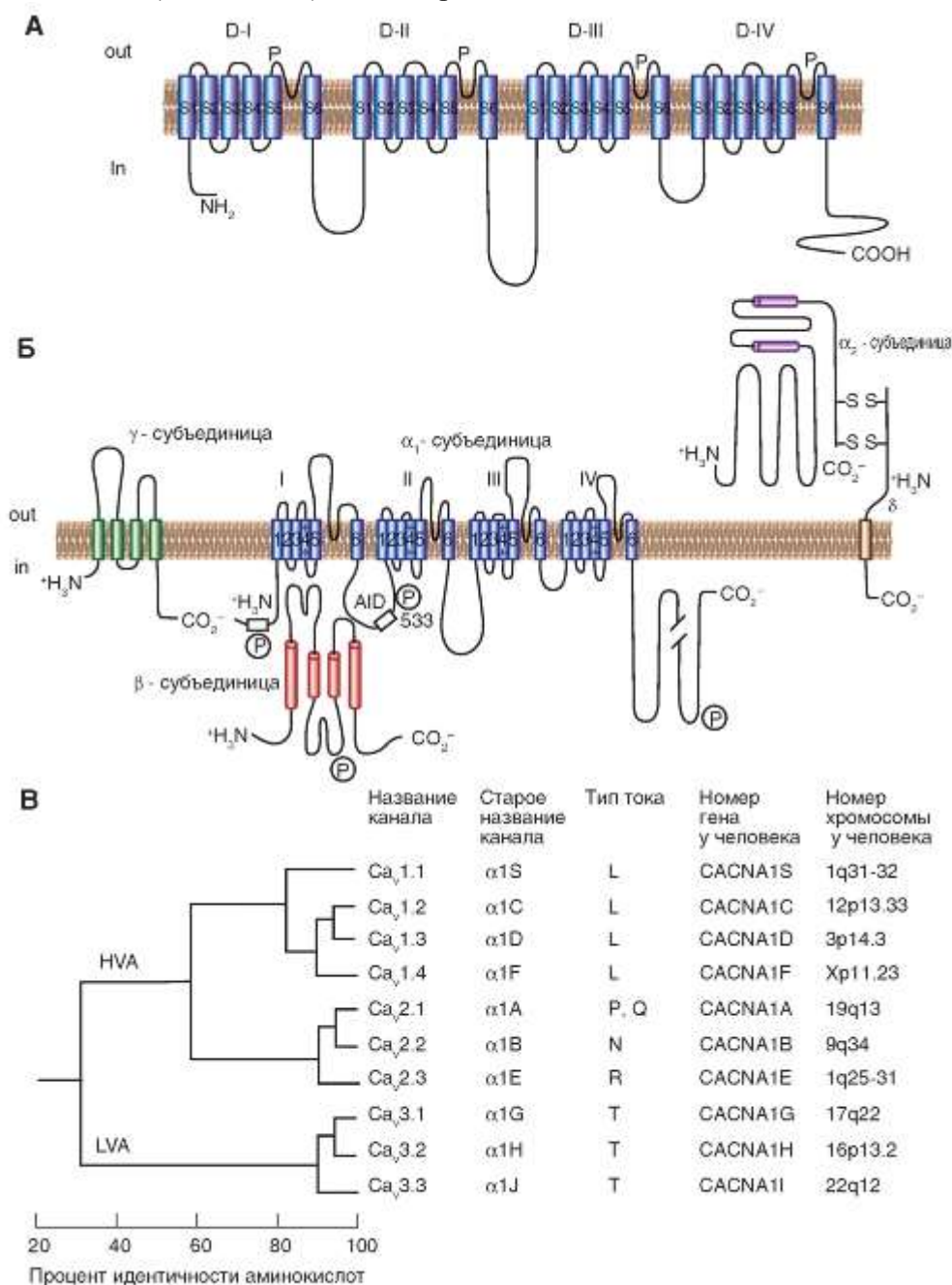
- химический символ главного иона, для которого они проницаемы (в данном случае ионы Ca²⁺);
- принцип физиологической регуляции работы канала, имея в виду, что эти каналы потенциалуправляемые (voltage gated calcium channels) Ca²⁺-каналы, что позволило ввести обозначение CaV (рис. 1-11 В).

Первая цифра после обозначения соответствует в субъединице номеру генного подсемейства (от 1 до 3 в настоящее время), а вторая цифра, которая ставится после точки, соответствует порядку открытия оригинальной изоформы α_1 субъединицы внутри этого подсемейства (от 1 до m). Соответственно этой номенклатуре, Ca_v1 подсемейство (от Ca_v1.1 до Ca_v1.4) включает каналы, содержащие α_{1S} , α_{1C} , α_{1D} и α_{1F} , для которых характерен L-тип кальциевых токов. Подсемейство Ca_v2 (от Ca_v2.1 до Ca_v2.3) включает каналы, содержащие α_{1A} , α_{1B} и α_{1E} , для которых характерен P/Q-тип, N-тип и R-тип кальциевых токов соответственно. Подсемейство Ca_v3 (от Ca_v3.1 до Ca_v3.3) включает каналы, содержащие α_{1G} , α_{1H} и α_{1I} , для которых характерен T-тип кальциевых токов.

Рис. 1-11. Планометрическая модель молекулярной организации потенциалуправляемого Ca²⁺-канала.

А - основная α_1 -субъединица, формирующая пору. Основные структуры α_1 -субъединицы показаны как трансмембранные цилиндры, представляющие собой α -спиральные сегменты. Б - модель выполнена на основе экспериментальных данных изучения структуры Ca²⁺-каналов, состоящих из пяти субъединиц. В дополнение к α_1 -субъединице представлена локализованная внутриклеточно β -субъединица и расположенная внеклеточно α_2 -субъединица, соединенная дисульфидной связью с δ -субъединицей в комплекс $\alpha_2\delta$. Масштаб длины линий приблизительно соответствует длине полипептидных сегментов. Участки различий в α_1 -субъединице между некоторыми Ca²⁺-каналами мембран клеток расположены в NH₂-концевой части в гидрофобных сегментах DIS6 и DIVS3 и в линкере (цитоплазматическом связующем участке) между доменами I и II. AID (α_1 -interaction domain) - первичная область связывания для всех Ca_v α_1 -субъединиц с Ca_v β -субъединицами, названная как α_1 -взаимодействующий домен.

Символом «Р» обозначены места фосфорилирования разными протеинкиназами. В - последовательное сходство α_1 -субъединиц потенциалуправляемых Ca^{2+} -каналов. Продемонстрировано филогенетическое дерево первичных последовательностей Ca^{2+} -каналов. В результате сравнения пар последовательностей четко дифференцированы три семейства с межсемейственными последовательностями, идентифицированными более чем 80% (Ca_v1 , Ca_v2 , Ca_v3). Далее сходство последовательности было определено для каждого семейства, и эти три последовательности были сравнены одна с другой с межсемейственными последовательностями, идентифицированными на 52% (Ca_v1 по сравнению с Ca_v2) и на 28% (Ca_v3 по сравнению с Ca_v1 или с Ca_v2)



Кальциевые токи

Ca^{2+} -каналы были обнаружены практически во всех клетках. Ca^{2+} -токи, зарегистрированные в различных типах клеток, имеют определенные физиологические и фармакологические свойства. Изначальная буквенная номенклатура была предложена

исходя из кинетик Ca^{2+} -токов. L-тип (от «*long-lasting*» - долго длящийся) Ca^{2+} -токов требует сильной деполяризации для активации, он долго длящийся и блокируется органическими антагонистами L-типа Ca^{2+} -каналов, включая дигидропиридины, фенилалкиламины и бензотиазепины. Ca^{2+} -токи L-типа являются главными в мышцах и эндокринных клетках, где они инициируют сокращение и секрецию. N-тип (от «*neither long nor transient*» - ни L, ни T), P/Q-тип и R-тип кальциевых токов также требуют сильной деполяризации для активации. Они относительно нечувствительны к антагонистами L-типа Ca^{2+} -каналов, но блокируются специфическими полипептидными токсинами из ядов улитки или паука. Эти токи в основном выражены в нейронах, где они инициируют нейротрансмиссию для большинства быстрых синапсов и также опосредуют вход Ca^{2+} в клеточные тела и дендриты. T-тип (от «*transient*» - преходящий) Ca^{2+} -токов активируется слабой деполяризацией, и эти токи мимолетные (преходящие). Они нечувствительны к органическим антагонистам и токсинам змей и пауков, которые используются для определения N- и P/Q Ca^{2+} -токов. Ca^{2+} -токи T-типа выражены в большом спектре клеточных типов, где они вовлечены в развитие потенциала действия и важны в клетках и тканях, обладающих ритмической активностью.

Молекулярная организация кальциевого канала

Ca^{2+} -каналы, которые были охарактеризованы биохимическими методами, представляют собой комплекс белков, образованный из четырех или пяти определенных субъединиц, кодирующихся большим семейством генов.

На молекулярном уровне Ca^{2+} -канал составлен из формирующей пору трансмембранной α_1 -субъединицы и вспомогательных $\alpha_2\delta$, β и γ -субъединиц (рис. 1-12 А). При этом α_2 -субъединица находится на внешней стороне мембраны, β -субъединица - на внутренней стороне мембраны, а δ - и γ -субъединицы представляют собой трансмембранные структуры. Структура Ca^{2+} -канала сердечной и гладкой мышцы - это структура с четырьмя субъединицами канала, и она напоминает Ca^{2+} -каналы нейрона. Вспомогательные $\alpha_2\delta$ - и β -субъединицы увеличивают транспорт ионов Ca^{2+} через пору, образованную α_1 -субъединицей, и модулируют потенциалзависимую кинетику канала. Внутриклеточная β -субъединица и трансмембранный дисульфид-связанный комплекс $\alpha_2\delta$ -субъединиц являются компонентами большинства типов Ca^{2+} -каналов. В дополнение к роли β -субъединицы в транспорте ионов через канал, она также играет принципиальную роль в электромеханическом сопряжении в мышечных волокнах скелетных мышц. Взаимодействия субъединиц $\alpha_2\delta$ - и β -субъединицы в настоящее время хорошо изучены. Наличие субъединицы γ было также обнаружено в Ca^{2+} -каналах скелетных мышц, в кардиомиоцитах и нейронах головного мозга. Хотя эти добавочные субъединицы модулируют свойства ионного канала, фармакологические и электрофизиологические особенности Ca^{2+} -каналов в основном связаны с существованием α_1 -субъединиц.

β -субъединицы Ca^{2+} -каналов способны формировать гетерогенные комплексы *in vivo* и *in vitro*. β -субъединицы и α_1 -субъединица обладают консервативными областями взаимодействия, что способствует формированию гетерогенных комплексов канала. $\alpha_2\delta$ -субъединицы модулируют различные α_1 -субъединицы *in vitro*, и возможно, что эта гетерогенность распространяется на ситуации *in vivo*. Такое разнообразие взаимодействия субъединиц потенциально увеличило бы число возможных вариантов каналов с отличающимися биофизическими и физиологическими свойствами, что может обеспечивать разнообразие клеточных ответов.

Физиологическая модель потенциалуправляемого Na^+ -канала показана на рисунке (рис. 1-12 Б).

Рис. 1-12. Объемная модель взаимодействий субъединиц потенциалуправляемого Ca^{2+} -канала.

A



K⁺-канал. Простейшее строение

Принятая в настоящее время классификация делит все K⁺-каналы на:

- потенциалуправляемые K⁺-каналы (K_V);
- Ca²⁺- активируемые K⁺-каналы (K_{Ca});
- K⁺-каналы аномального выпрямления с током входящего направления (*inward rectifier K⁺-channels*) (K_{ir});
- K⁺-каналы с двумя петлями в домене (*two-P K⁺-channels*) (K_{2P}).

Описание молекулярной организации K⁺-каналов мы начнем с наиболее простой формы, представленной, например, в бактерии *Streptomyces lividans*. Модель молекулярной организации такого наиболее простого K⁺-канала бактерии *Streptomyces lividans* продемонстрирована на рис. 1-13.

Показанный на рис. 1-13 А K⁺-канал бактерий состоит из четырех одинаковых субъединиц, объединенных в единое целое тело канала.

На панелях Б, В и Г показано, что Р-петля локализована около внеклеточной поверхности мембраны и объединяет α-спирали обоих сегментов S5 и S6. Она состоит из неспиральной части, формирующей верхнюю часть поры, короткой α-спирали и удлиняющей петли, которая выдается в сужающуюся часть поры и формирует селективный фильтр. Этот фильтр позволяет проходить через канал только ионам K⁺, но не другим ионам. Ниже фильтра находится центральная часть поры, образованная α-спиралью сегмента S6. В тетрамерном K⁺-канале бактерии *Streptomyces lividans* сегменты S5 и S6 обозначены так, поскольку они представляют собой структурные эквиваленты сегментов S5 и S6 в потенциалуправляемом K⁺-канале (рис. 1-13).

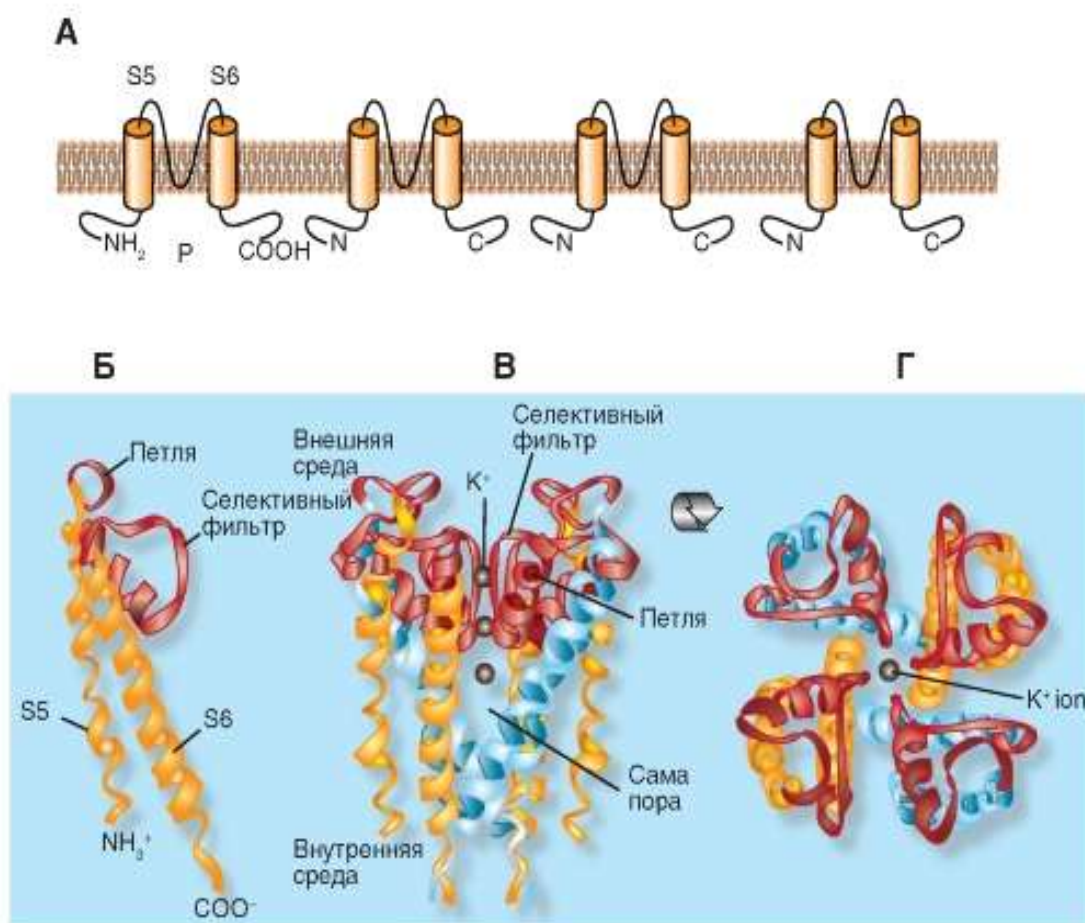
На рисунке 1-13 Б показаны структурные детали канала. NH₂-конец субъединицы начинается наружной спиралью (оранжевая), пронизывающей мембрану от цитоплазматической стороны до наружной поверхности. За наружной спиралью следует короткая спираль (красная), направленная в пору. Затем следует внутренняя спираль, которая возвращается к цитоплазматической стороне (оранжевая). Соединяющая петля между наружной и короткой спиралью образует структуру, формирующую наружное отверстие поры. Эта часть содержит центр связывания для неселективного блокатора K⁺-каналов тетраэтиламмония (ТЭА). Четыре таких петли каждой субъединицы формируют внешние стенки поры, а именно той ее части, которая ответственна за селективность канала - селективный фильтр.

Избирательность канала достигается как размером его поры, так и молекулярной организацией селективного фильтра. Диаметр селективного фильтра равен примерно 0,3 нм. Аминокислоты его стенки ориентированы так, что последовательные кольца, образованные четырьмя карбоксильными группами (по одной от каждой субъединицы), обращены внутрь поры. Диаметр поры достаточен для прохождения дегидратированного иона K⁺, имеющего диаметр 0,27 нм. Атомы кислорода в стенке поры заменяют гидратацию иона. Ионы меньшего размера, например Na⁺, с диаметром 0,19 нм, не могут проходить через K⁺-канал, поскольку они не могут сформировать тесную связь одновременно со всеми четырьмя кислородами стенки поры. Этот механизм в деталях представлен на рис. 1-19.

Рис. 1-13. Модель молекулярной организации наиболее простого K⁺-канала бактерии *Streptomyces lividans*.

А - этот K⁺-канал представляет собой тетрамер из идентичных субъединиц, каждая из которых содержит две сходные трансмембранные α-спирали, обозначаемые как S5 и S6, и короткую Р-петлю, формирующую пору. Б - организация одной из четырех субъединиц.

Показаны S5 и S6 α -спирали (желтые на рисунке) и петля P (розовая). В - тетрамерная организация канала. Вид сбоку. Г - тетрамерная организация канала. Вид сверху



Потенциалуправляемые K⁺-каналы (K_v)

K_v каналы образованы белковыми субъединицами двух типов: α -субъединицами, формирующими пору, и вспомогательными β -субъединицами. Субъединицы α формируют тетрамер, чтобы образовать функциональный канал, проводящий ионы K⁺.

Одна субъединица K_v-канала - белок с шестью трансмембранными сегментами (S) α -спирали (S1-S6) и расположенными в цитоплазме N- и C-терминалями. Наиболее изучены внеклеточная петля P между 5S и 6S (формирует K⁺-селективный фильтр и пору канала) и 4S, который положительно заряжен и формирует сенсор напряжения белка (рис. 1-14 А). Кроме того, много функций обычно приписывали большим N- и C-концевым петлям. Они включают контроль за инактивацией каналов, белок-белковое взаимодействие (по типу тетрамеризации α -субъединиц, взаимодействие с цитоплазматическими β -субъединицами и сохранение последовательностей).

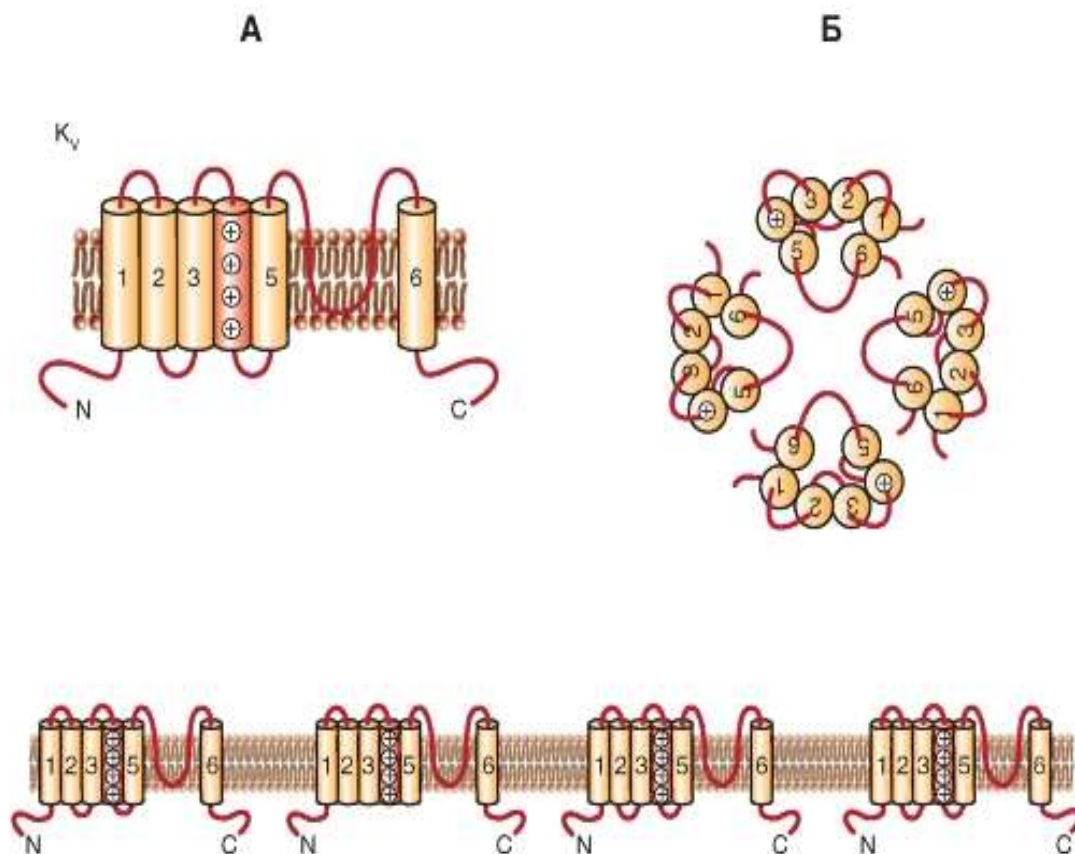
K_v α -субъединицы могут формировать или гомотетрамеры (*homotetramers*), или гетеротетрамеры (*heterotetramers*), вероятно, ограниченные в том же самом подсемействе. Огромное разнообразие K_v-токов *in vivo* есть следствие существования сплайсинговых вариантов (изоформ гена, кодирующих одну и ту же α -субъединицу), сборки тетрамера α -субъединиц с различными вспомогательными субъединицами и гетеромеризация α -субъединиц.

Как известно, ионы K⁺ неэквивалентно распределены между внеклеточной средой и цитоплазмой, и это создает движущую силу для выхода ионов K⁺ в больших

физиологических пределах мембранного потенциала. K_v -каналы открыты при деполяризации трансмембранного потенциала, что способствует выходу ионов K^+ . Деполяризация может быть представлена как аккумуляция позитивных зарядов на внешней стороне мембраны. Однако выход позитивно заряженных ионов, таких, как ионы K^+ , сдвигает мембранный потенциал ниже потенциала покоя. Таким образом, K_v -каналы чувствуют деполяризацию и, в свою очередь, действуют так, чтобы ее устранить. Одна из наиболее охарактеризованных ролей K_v -каналов заключается в том, чтобы закончить сильную деполяризацию, вызванную активацией потенциалзависимого входа катионов (совместно образующих потенциал действия). Таким образом, можно постулировать, что любые увеличения K_v -канальной активности будут приводить к более эффективному окончанию деполяризации (обычно укорачивая или убирая потенциал действия). Эта функциональная способность K_v -каналов также лежит в основе формирования пачечной активности (взрывной). Таким образом, активность K_v -каналов играет, например, роль в кодировании информации в нервной системе.

Рис. 1-14. Планометрическая модель молекулярной организации потенциалуправляемого K^+ -канала (K_v -канала).

А - одна субъединица K_v -канала представляет собой α -спираль с шестью трансмембранными сегментами (S1-S6) и расположенными в цитоплазме N- и С-терминалями. Внеклеточная Р-петля между сегментами S5 и S6 формирует селективный фильтр для ионов K^+ и пору канала, а положительно заряженный сегмент S4 формирует сенсор напряжения белка. Длинные N- и С-терминальные петли контролируют инактивацию каналов и белок-белковое взаимодействие. Б - ассоциация четырех субъединиц в K_v -канал



Семейство K_v

До настоящего времени в геноме человека описаны 38 генов, кодирующих различные каналы суперсемейства K_v . K_v -каналы включают классические категории каналов: K^+ -каналы задержанного выпрямления (*delayed rectifier K^+ -channels*) и быстрые транзиторные K^+ -каналы выходящего тока (*fast transient K^+ -channels*: *fast transient K^+ -current I_A* , или *transient outward current I_{to}*).

Название «*delayed rectifier K^+ -channels*» было первоначально дано потенциалуправляемым K^+ -каналам гигантского аксона кальмара из-за их отсроченной активации (по сравнению с быстро активизирующимися Na^+ -каналами). Члены всех K_v подсемейств (включая K_v1-4 , EAG и KCNQ) могут формировать *delayed rectifier K^+ -channels*.

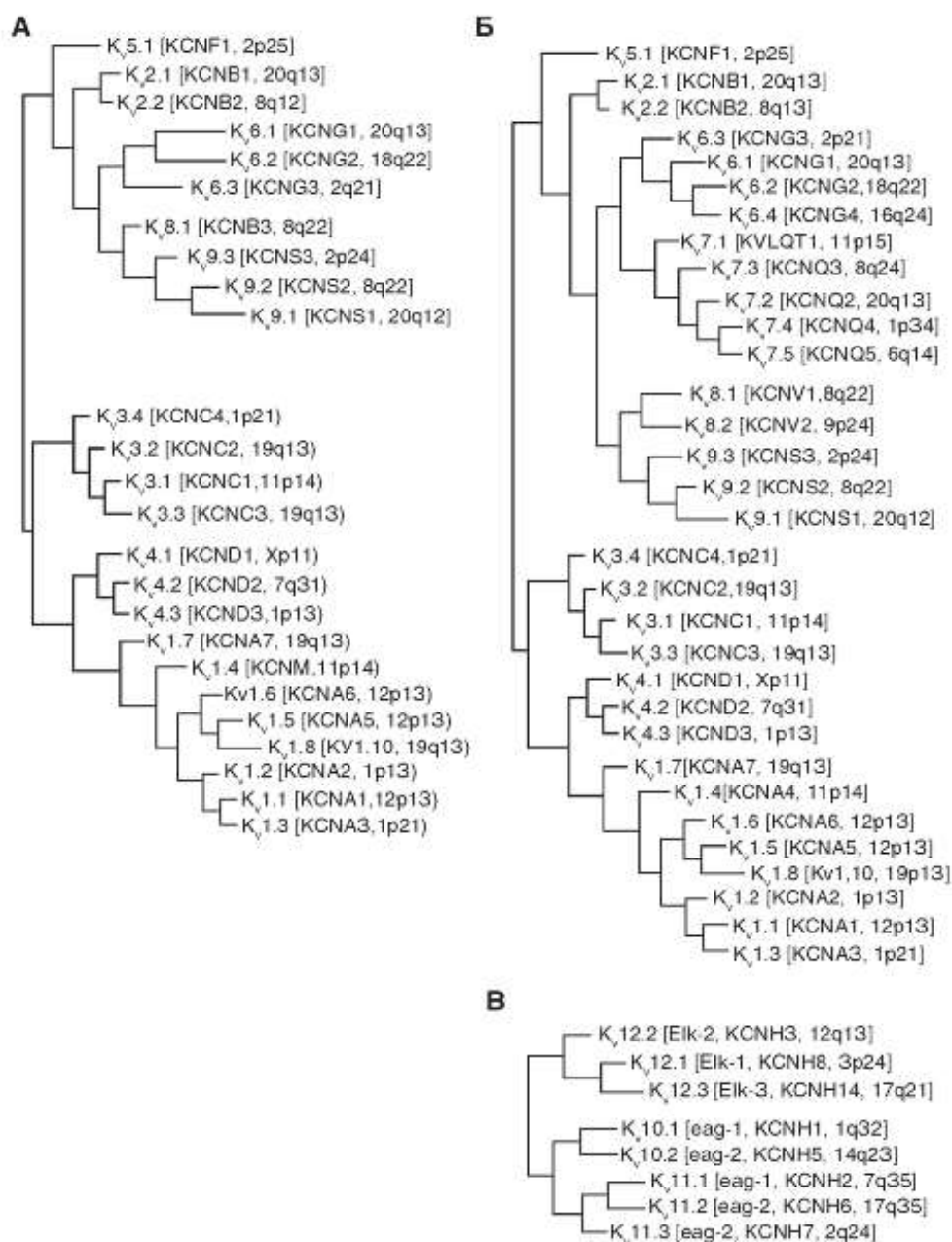
Fast transient K^+ -channels (формирующие *fast transient K^+ -current*: I_A , или *transient outward current I_{to}*) - быстрые транзиторные K^+ -каналы выходящего тока представляют собой каналы, активируемые низким потенциалом (*low voltage-activated*). Они быстро инактивирующиеся (транзиторные, иначе - временные, мимолетные K^+ -каналы). Каналы этого типа обычно образованы из членов

K_v1 и K_v4 подсемейств и вспомогательной β -субъединицы, часто необходимой для феномена быстрой инактивации. Недавно была обнаружена новая вспомогательная субъединица - CD26, родственная дипептидил аминопептидазоподобному протеину (*Dipeptidyl Aminopeptidase-подобный белок, DPPX*), и это позволило присвоить каналу нейронов характеристику K_v4 -каналов.

Филогенетические деревья K_v -каналов продемонстрированы на рис. 1-15. На нем при филогенетической реконструкции, основанной на сходной аминокислотной последовательности, показаны потенциалуправляемые (*voltagegated*) K^+ -каналы семейств K_v1-K_v6 , K_v7 и K_v8-K_v9 . Среди этой группы только $K_v1.8$ в настоящее время испытывает недостаток в названии HGNC. Пять членов группы K_v семейства K_v7 (KCNQ1-KCNQ5) в настоящее время (с 2005 г.) могут быть внесены в союз с другими белками канала K_v , и поэтому не показаны в отдельном филогенетическом дереве, как это представлялось ранее. Три оставшиеся семейства K_v - K_v10 , K_v11 и K_v12 - достаточно близко связаны друг с другом, чтобы быть показанными в отдельном филогенетическом дереве.

Рис. 1-15. Филогенетические деревья для семейства K_v .

А - филогенетическое дерево для семейства K_v1-K_v9 -каналов. Аминокислотные последовательности K_v -канала включают K_v1-K_v6 и K_v8-K_v9 семейства, которые были внесены до 2005 г. Б - последовательности $K_v7.1-K_v7.5$, $K_v6.4$ и $K_v8.2$ были добавлены к существующему филогенетическому дереву. Только гидрофобные ядра канала (S1-S6) использовались для анализа. В - филогенетическое дерево для семейств K_v10-K_v12 -каналов



Группы K_{ir}

Следующий класс 2S-белков включает три группы каналов *inward rectifiers channels* (K_{ir}), которые можно назвать, хотя и очень длинно, как «K⁺-каналы аномального выпрямления с током входящего направления». N- и C-терминалы этих каналов также расположены в цитоплазме, Р-петля между двумя трансмембранными доменами формирует пору, и функционирующий канал представляет собой тетрамер этих 2S/1P-субъединиц.

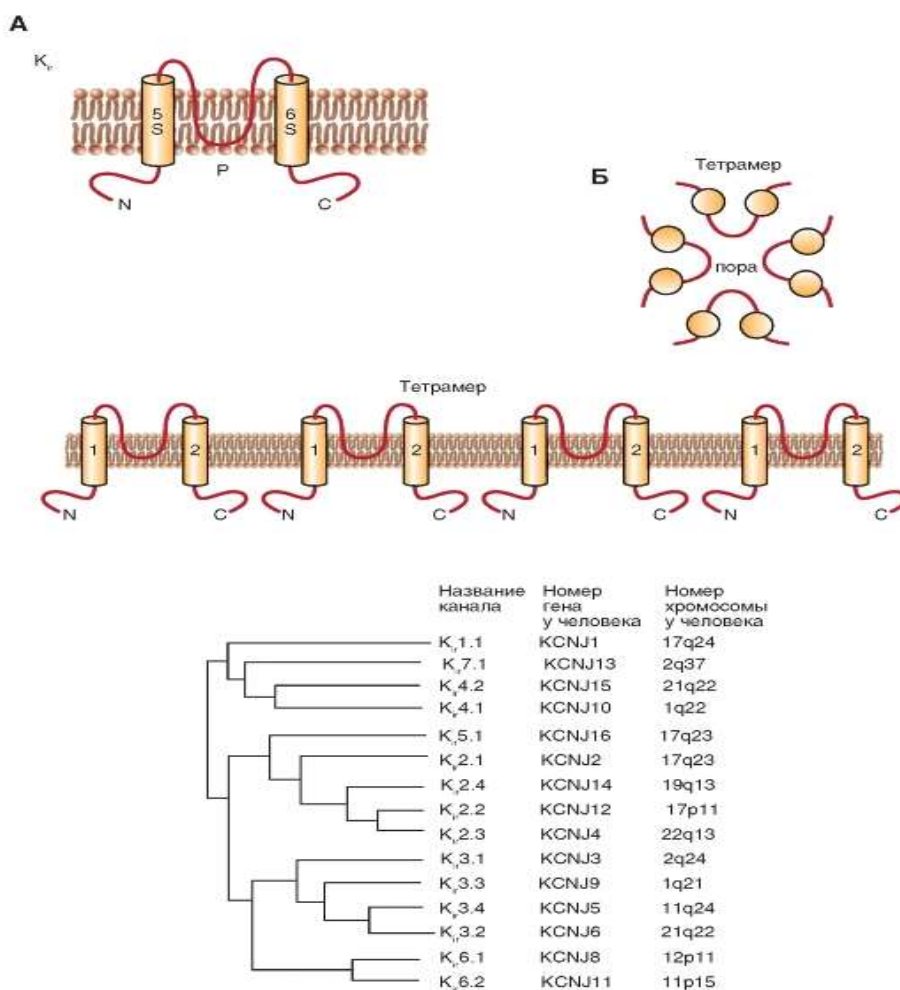
Клонирование первых *inward rectifiers K⁺-channels* - K_{ir}1.1 (ROMK1) и K_{ir}2.1 (IRK1) - было осуществлено в 1993 г., и последовательность новых членов этого семейства была идентифицирована, включая K-канал, связанный с G-белком, (K_{ir}3) и АТФ-чувствительный K-канал (K_{ir}6). Эти каналы играют важную физиологическую роль в функции многих органов, включая мозг, сердце, почки, эндокринные клетки, слуховые клетки и клетки сетчатки. Молекулярная организация этих каналов приведена на рис. 1-16 А. Филогенетическое дерево, показанное на рис. 1-16 Б, иллюстрирует родственные связи,

основанные на последовательности аминокислотных остатков, между семью основными подсемействами K_{ir} . В настоящее время новые члены этого семейства не были идентифицированы. Поскольку это филогенетическое дерево появилось только в 2002 г. в издании IUPHAR, маловероятно, что какие-либо другие новые члены были обнаружены за это время.

В последнее время метод рентгеноструктурной кристаллографии дал возможность описать структуру цитоплазматического региона $K_{ir}3.1$, полную структуру бактериальных $K_{ir}1.1$ и цитоплазматическую область $K_{ir}2.1$. Эти данные демонстрируют, что *inward rectifiers* K^+ -channels имеют длинную пору, уходящую в цитоплазму, и подчеркивают важность отрицательных зарядов аминокислотных остатков на стенке цитоплазматической части поры, которая играет важную роль аномального выпрямления. Эти исследования обеспечили понимание механизмов регулирования ворот канала посредством лигандов через G-белки и фосфатидилинозитол 4,5-бисфос-фат. Информация, полученная благодаря анализу кристаллической структуры, чрезвычайно ценна, так как позволяет оценить структурно-функциональные отношения. Также примечательны издания, посвященные изучению динамических аспектов функции канала.

Рис. 1-16. Молекулярная организация *inwardly rectifying potassium channels* - K^+ -каналов аномального выпрямления с током входящего направления (K_{ir}).

А - одна субъединица K_{ir} -канала представляет собой α -спираль с двумя трансмембранными сегментами (S5 и S6), расположенными в цитоплазме N- и С-терминалями, и короткую Р-петлю, формирующую пору. Б - ассоциация четырех субъединиц в K_{ir} -канал. В - филогенетическое дерево для K_{ir} -каналов



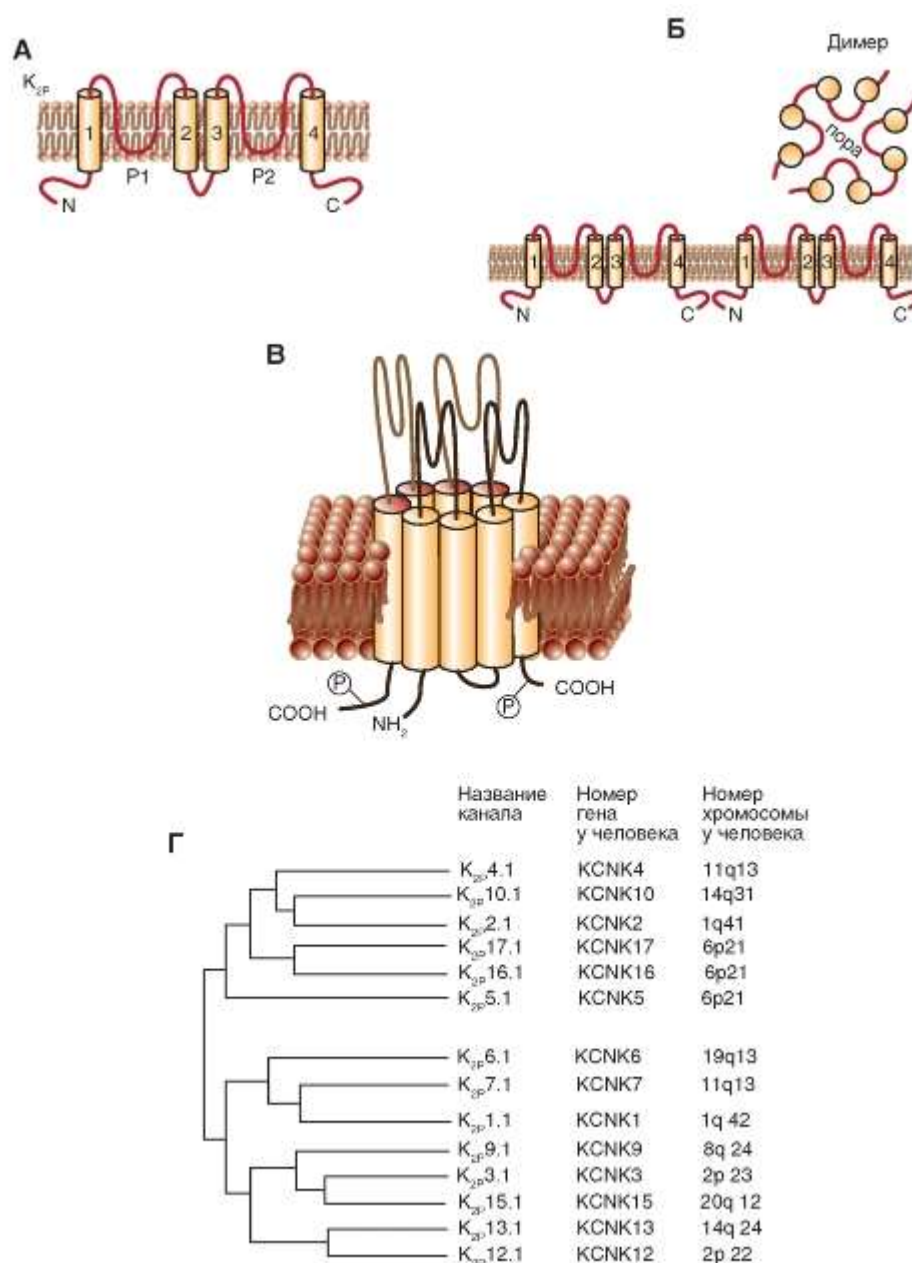
K^+ -каналы с двумя петлями в домене (*two-P potassium channels* - K_{2P})

Меньше чем за десятилетие, начиная с открытия K_{2P} -каналов, их изучение показало, что базовая утечка ионов K^+ через специализированные пути представляет собой эффективно регулируемый механизм контроля возбудимости клеток. Пути утечки ионов K^+ , активные в покое, стабилизируют мембранный потенциал ниже порога генерации взрывной (пачечной) активности и ускоряют реполяризацию. Хотя существование токов утечки было предположено в 1952 г. Hodgkin и Huxley, они оставались биофизическим курьезом в течение пяти десятилетий. Идентификации первых молекулярных механизмов тока утечки ионов K^+ способствовало клонирование K^+ -каналов с двумя пороформирующими петлями в каждой субъединице и четырьмя трансмембранными сегментами (или восемью трансмембранными сегментами) в *Saccharomyces cerevisiae* и *Caenorhabditis elegans*. После этого K_{2P} был изолирован из нервно-мышечной ткани *Drosophila melanogaster*. Биофизические характеристики показали, что K_{2P} должен быть K^+ -селективным каналом с определенными параметрами проводимости, т.е. с потенциалнезависимым воротным механизмом, и предсказанным Goldman, Hodgkin, Katz выпрямлением. Когда концентрация ионов K^+ симметрична с двух сторон мембраны, K_{2P} -ток и демонстрируют линейную зависимость от потенциала. При физиологических условиях (высокая концентрация ионов K^+ внутри и низкая снаружи) K_{2P} проводит более значительный ток из клетки, чем внутрь клетки. Наблюдается поток ионов, направленный в большей степени наружу, чем внутрь клетки.

Поразительная черта K_{2P} -каналов - организация их субъединицы. Каждая имеет две Р петли и четыре S сегмента (рис. 1-17 А). Эта отличающаяся топология (2Р/4S) может быть найдена в более чем 70 предсказанных гомологах в базе данных, полученных при изучении генома. Пятнадцать генов млекопитающих в семействе обозначены как гены KCNK, кодирующие K_{2P} -каналы (рис. 1-17 Б и В). При экспрессии легко обнаруживается функция ионного канала. Как ожидалось, для регуляторов возбудимости K_{2P} -каналы находятся под сильным контролем множества химических и физических стимулов, включая напряжение кислорода, рН, липиды, механические растяжения, нейротрансмиттеры и рецепторы, связанные с G-белком. Каналы также служат молекулярными мишенями для некоторых летучих и местных анестетиков. Регуляция K_{2P} -каналов связана с изменениями в их свойствах, например вероятности открытия каналов. Тем не менее некоторые регуляторные изменения, например фосфорелирование K_{2P2} , обеспечивает появление выпрямляющих свойств с чувствительностью к потенциалу.

Рис. 1-17. Молекулярная организация для *two-P potassium channels* - K^+ -каналов с двумя петлями в домене (K_{2P}). Обратите внимание, что этот канал выполняет функцию так называемого канала утечки.

А - одна субъединица K_{2P} -канала представляет собой α -спираль с четырьмя трансмембранными сегментами, расположенными в цитоплазме N- и C-терминалями, и двумя Р-петлями, формирующими пору. Б - ассоциация двух субъединиц в K_{2P} -канал. В - объемное изображение K_{2P} -канала. Г - филогенетическое дерево для K_{2P} -каналов



Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы (K_{Ca})

Молекулярная организация K_{Ca}-каналов представлена на рис. 1-18 А, Б. Филогенетическое дерево, представленное на рисунке, иллюстрирует факт, что эти каналы формируют две хорошо определенные, но только отдаленно связанные группы. Одна из этих групп включает три K_{Ca}-канала с низкой проводимостью (K_{Ca}2.1, K_{Ca}2.2 и K_{Ca}2.3), а также канал K_{Ca}3.1 с промежуточной проводимостью. Эти каналы не потенциалуправляемы и активируются низкими концентрациями внутриклеточного Ca²⁺ (<1,0 μ M), в отличие от K_{Ca}1.1 (KCNMA1, Slo1), который активируется и потенциалом, и внутриклеточным Ca²⁺. Эти три K_{Ca}-канала с низкой проводимостью чувствительны к блокирующему действию апамина (100 пМ-10 нМ), что отличает их от всех других K_{Ca}-каналов. И K_{Ca}-каналы с низкой проводимостью, и каналы с промежуточной проводимостью играют важную роль во многих процессах, включающих Ca²⁺-зависимый сигналинг в электровозбудимых и электронеовозбудимых клетках. Они не связывают свободные ионы Ca²⁺ непосредственно, а скорее, обнаруживают Ca²⁺ через кальмодулин, постоянно связанный с С-терминальным регионом. Связывание кальция с

этим кальмодулином приводит к конформационным изменениям, которые, в свою очередь, ответственны за воротный механизм канала.

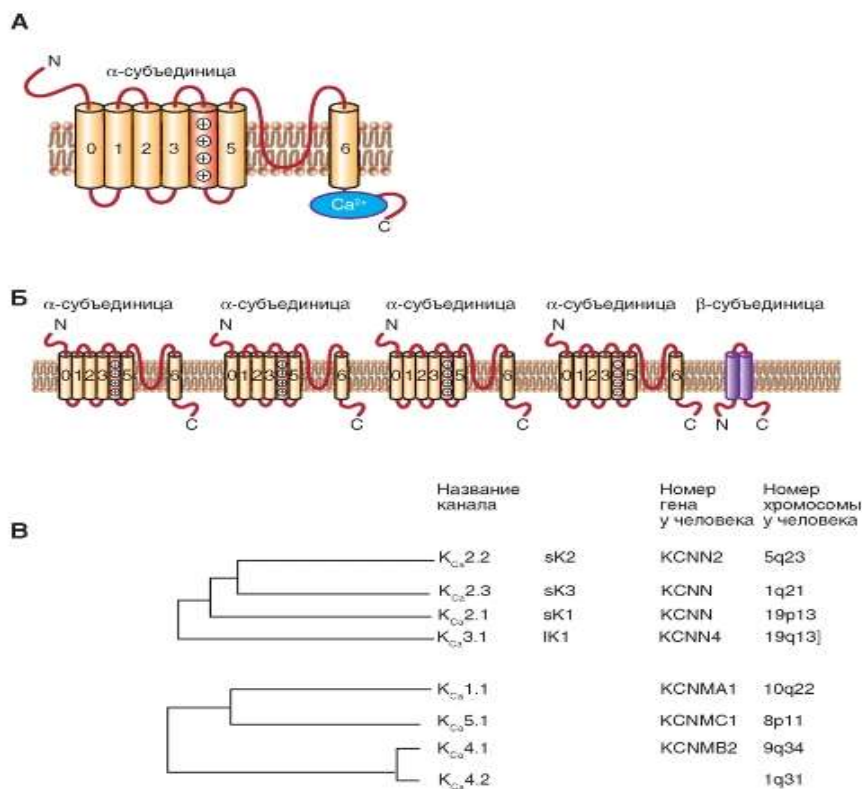
Филогенетическое дерево, показанное на рис. 1-18 В, иллюстрирует зависимость последовательностей группы K_{Ca} -каналов, которая включает $K_{Ca}1.1$ (Slo или Slo1), $K_{Ca}4.1$ (Slack или Slo2.2), $K_{Ca}4.2$ (Slick или Slo2.1) и $K_{Ca}5.1$ (Slo3). Каналы $K_{Ca}1.1$ изучали в клетках мозга, улитки и мышцах, и известно, что чередующиеся сплайсинги их мРНК ответственны за их значительные функциональные различия. В отличие от $K_{Ca}2$ - и $K_{Ca}3$ -каналов, связывание ионов Ca^{2+} -каналом

$K_{Ca}1.1$ не зависит от его ассоциации с кальмодулином, но полагают, что оно определяется, по крайней мере, тремя связывающими двухвалентные катионы участками в цитоплазматической карбоксильной области каждой субъединицы канала. Два независимых высоко чувствительных Ca^{2+} -связывающих участка, названные «*calcium bowl*», сформированы отрицательно заряженными сегментами в дистальной карбоксильной терминали белка и внутри первой RCK области, кодирующей проксимальную С-терминаль белка. Третий низкоафинный участок, связывающий двухвалентные катионы, также найден в первой RCK области, которая способствует активации Mg^{2+} и Ca^{2+} при высоких концентрациях (>1 mM).

Три других члена этой группы ($K_{Ca}4.1$, 4.2 и 5.2) были включены в K_{Ca} -спецификацию, так как все они являются членами этой структурно связанной группы генов. Однако в настоящее время появилось больше информации о функциональных свойствах членов этого семейства генов, чем было известно несколько лет назад, когда эти наименования были предложены, и это представляет возможную задачу для спецификации, основанной, скорее, на функциональном сходстве, чем на структурном. В отличие от найденных членов $K_{Ca}1.1$, фактически активирующихся внутриклеточным Ca^{2+} , ни один из других членов этой группы, по-видимому, не может быть также активирован Ca^{2+} . Фактически, главным образом, эти три нечувствительных к внутриклеточному Ca^{2+} каналы $K_{Ca}4.2$ и $K_{Ca}4.1$, активируются внутриклеточными ионами Na^{+} и Cl^{-} , а $K_{Ca}5.1$ активизируется внутриклеточным защелачиванием (сдвигом pH в щелочную сторону). Таким образом, хотя они структурно связаны с $K_{Ca}1.1$, эти три канала не могут быть описаны правильно как «калиевые каналы, активируемые кальцием» на основе функциональных критериев. Это может быть темой для обсуждения среди исследователей данной области.

Рис. 1-18. Кальцийактивируемые K^{+} -каналы.

А - одна субъединица K_{Ca} -канала представляет собой молекулу с семью трансмембранными сегментами (S0-S6) и расположенной в цитоплазме С-терминалью и во внеклеточной среде N-терминалью. Внеклеточная петля Р между S5 и S6 формирует K^{+} -селективный фильтр и пору канала, а положительно заряженный 4S формирует сенсор напряжения. Б - ассоциация четырех субъединиц в K_{Ca} -канал. В - филогенетическое дерево для K_{Ca} -каналов. Первая группа включает в себя $K_{Ca}2$ -, $K_{Ca}3$ -каналы. Вторая группа включает $K_{Ca}1$ -, $K_{Ca}4$ -, $K_{Ca}5$ -каналы. До настоящего времени к этой топологии никакие новые каналы не добавлены



Механизмы ионной селективности

Механизмы ионной селективности и проведения ионов через пору каналы частично изучены. Общие представления сводятся к следующему. На рис. 1-19 А представлены гидратированные ионы K^+ и Na^+ и их состояние в растворе и в поре. Когда ионы K^+ проходят через селективный фильтр, они теряют связанные с ними молекулы воды и вместо воды начинают кооперироваться с восемью атомами кислорода карбоксильных групп скелета основной цепи молекулы белка, четыре из которых показаны на рис. 1-19 Б. Это фрагмент аминокислотной последовательности каждой Р-петли. Меньшие по диаметру ионы Na^+ , вдобавок имеющие «более тесную рубашку» из молекул воды, не могут эффективно кооперироваться с атомами кислорода и поэтому проходят через K^+ -канал крайне редко.

На рис. 1-19 Б показаны только две находящиеся в противоположном положении субъединицы канала. Внутри селективного фильтра каждый обезвоженный ион K^+ взаимодействует по длине поры с восемью атомами кислорода (красные хвостики на схеме), два из каждой из четырех субъединиц, так чтобы заменить восемь молекул воды.

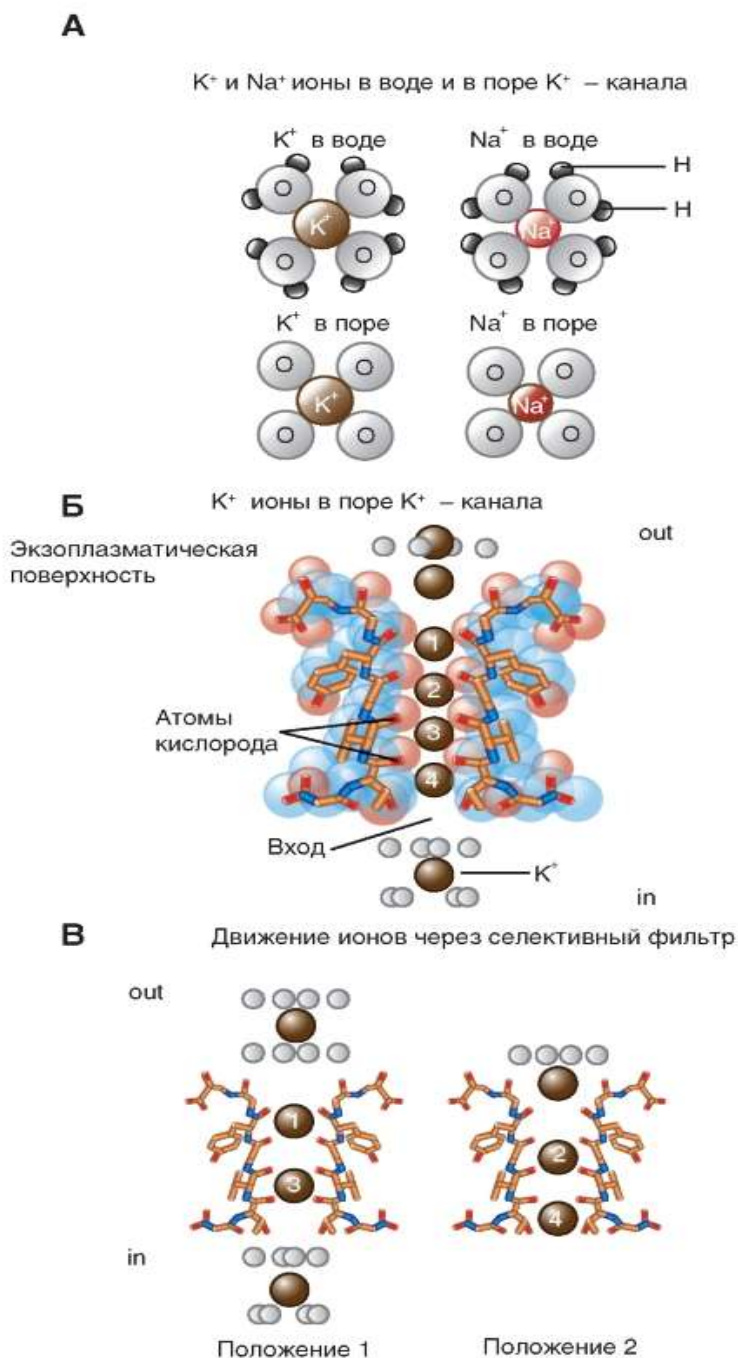
На рис. 1-19 В продемонстрированы два альтернативных состояния, при которых ионы K^+ двигаются через канал. В состоянии (1), когда движение идет так, что мы его наблюдаем, глядя из эктоплазматической стороны внутрь канала, можно увидеть гидратированный ион K^+ вместе с восемью связанными молекулами воды. Кроме того, показаны ионы K^+ в позиции 1 и 3 внутри селективного фильтра, а также тот же полностью гидратированный ион K^+ внутри устья канала.

В процессе движения ионов K^+ каждый ион в состоянии (1) двигается одним шагом внутрь канала, образуя состояние (2). Таким образом, в состоянии (2) ион K^+ на эктоплазматической стороне канала потерял 4 из 8 молекул воды, ион в позиции 1 в состоянии (1) перемещается в позицию 2, и ион в позиции 3 в состоянии (1) двинулся в

позицию 4. Во время перемещения из состояния (2) к состоянию (1) ион K^+ в позиции 4 двинулся в устье канала и приобрел восемь молекул воды, в то время как другой гидратированный ион K^+ двинулся в канал.

Рис. 1-19. Механизмы ионной селективности и проведения ионов Na^+ и K^+ через K^+ -канал бактерии *Streptomyces lividans*.

А - схема гидратированных и дегидратированных ионов Na^+ и K^+ в растворе и в поре K^+ -канала. Б - схема электронной плотности, полученная с высоким разрешением методом рентгеновской кристаллографии, демонстрирует ионы K^+ , проходящие через селективный фильтр. С - интерпретация карты электронной плотности, демонстрирующая два альтернативных состояния, при которых ионы K^+ двигаются через канал



Сенсор напряжения

Работа сенсора напряжения была изучена в основном на примере K^+ -канала. Как полагают в настоящее время, первые четыре (S1-S4) функционируют как сенсор напряжения, а последние два (S5-S6) формируют проводящую пору. В области сенсора напряжения сегмент S4 имеет последовательность из четырех или более остатков аргинина или остатков лизина, причем каждый отделен двумя гидрофобными остатками, которые перемещаются в электрическом поле мембраны при изменении потенциала на мембране. Движение этих заряженных аминокислотных остатков было зарегистрировано экспериментально (так называемый воротный ток). Более того, было показано, что открытие одного канала сопровождается движением части белка с общим зарядом 13 элементарных зарядов (e_0).

После работ группы MacKinnon Katz была представлена оригинальная «модель весла», построенная на основе идеи о погруженных в липид сегменте S2 и S1-S2-петли. Структура позволяла допустить, что сенсор напряжения располагается на N-терминали, ограниченной петлей S3, и/или на их С-терминали, ограниченной острым поворотом на остатке глицина в S5. Первые несколько поворотов, соответствующие части С- терминали из традиционного определения S4, упомянуты здесь как S4-S5-линкер. Пластичность последнего позволяет «веслам» сенсора напряжения двигаться свободно относительно белкового «тела» канала, расположенного внутри мембраны (рис. 1-20 А).

Основные заключения последних исследований следующие:

- сегменты S1, S2, S3 и S4 спиральные трансмембранные;
- петли не защищены от водной среды;
- заряды, которые несет S4, не расположены в липидном слое (рис. 1-20 Б).

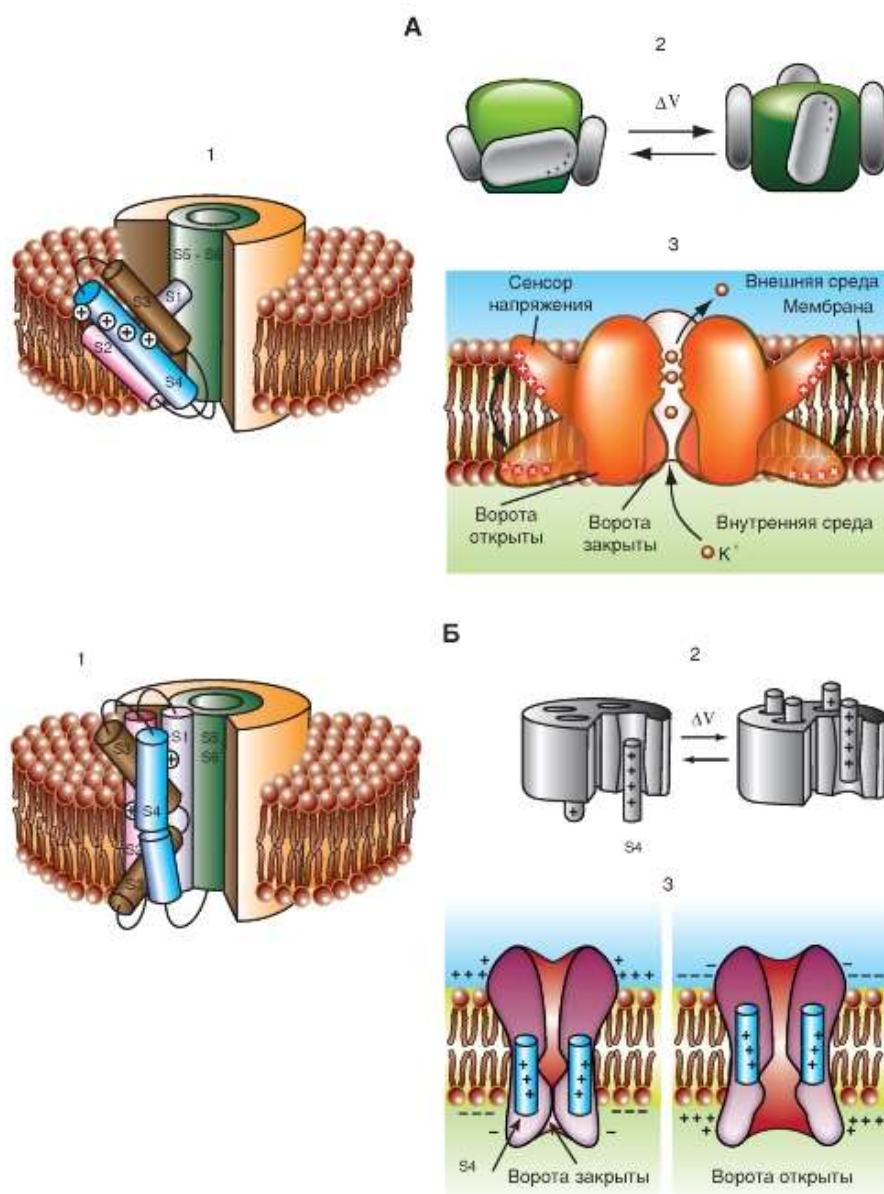
Результаты исследований дают неопровержимое доказательство того, что воротные заряды сегмента S4 частично «выставлены» во внеклеточный раствор. Это принципиально расходится с концепцией гидрофобного катиона, центрального пункта в «модели весла».

Другой спорный вопрос касается степени смещения сегмента S4 поперек мембраны после активации канала. Для «модели весла» перемещение должно быть не менее 15-20 Е, тогда как в традиционных моделях это перемещение не превышает 5 Е. Результаты исследований методом резонансного переноса энергии показали, что вертикальное смещение сегмента S4 не превышает 2 Е. Столь небольшое движение не соответствует «модели весла» и поддерживает альтернативную модель, в которой белок формирует профиль электрического поля, фокусируя его поперек узкого региона сегмента S4. Мощное, но локальное электрическое поле в непосредственной близости от воротных зарядов объясняет, почему требуется лишь маленькое движение, чтобы перенести 13 e_0 через локальную разность потенциалов при открытии канала.

Рис. 1-20. Гипотеза воротного движения зарядов. Схематические представления оригинальной «модели весла» и топологическая модель *Cuello et al.* в открытои/инактивированном состоянии. На каждой из двух панелей внутриклеточная часть расположена внизу, а внеклеточная часть - сверху.

А - (1) «модель весла», как ее представляли *Jiang et al.* Сегменты S1-S4, S5-S6 - пора. В этой модели S1- и S2-сегменты вложены в двойной слой, и заряды S4 обращены в бислой. (2) В «модели весла» воротные заряды (надписанный плюс) можно было бы переносить через мембрану от внутренней поверхности (низ) до внешней поверхности (верх) движением весел сенсора напряжения внутри липидного слоя мембраны, что, в свою очередь, могло открыть пору. (3) *MacKinnon et al.* нашли, что сенсоры напряжения в бактериальном калиевом канале - заряженные «весла», движение которых осуществляется через жидкую мембрану в сторону внутриклеточной среды. Четыре сенсора напряжения

(два из которых показаны на рисунке) связаны механически с воротами канала. Каждый сенсор напряжения имеет четыре привязанных положительных заряда (аргининовые аминокислоты). Высокая чувствительность ворот канала к потенциалу объясняется фактом, что открытие канала сопровождается перемещением в общей сложности 16 зарядов поперек мембраны. Хотя в 2007 г. сами авторы опровергли теорию «весла», она вошла во все зарубежные учебники, изданные в 2008 г. Именно поэтому мы вынуждены привести теорию «весла», отмечая ее несостоятельность. В следующей части рисунка (Б) мы приводим классическую теорию. Б - (1) топология, как это предложено *Cuellar et al.* Сегменты S1-S4, S5-S6 - пора. S1 и S2 - это трансмембранные сегменты, S1 окружен остальной частью белка. S4-сегмент расположен на периферии, но его заряды направлены от бисюля и в центр белка с более внеклеточным зарядом, экспонированным в регион перехода бисюля липида. Поскольку большинство зарядов прикрито сегментом S4, показаны только первый и четвертый заряды. (2) Обычная модель *voltage-dependent gating* устанавливает, что воротные заряды перемещаются через ядро белка трансляцией и/или вращением-ротацией S4 спиралей, которые двигаются независимо от других белковых сегментов в пределах ворот поры. (3) Модель перемещения S4 в канале, приводящего к открытию или закрытию ворот



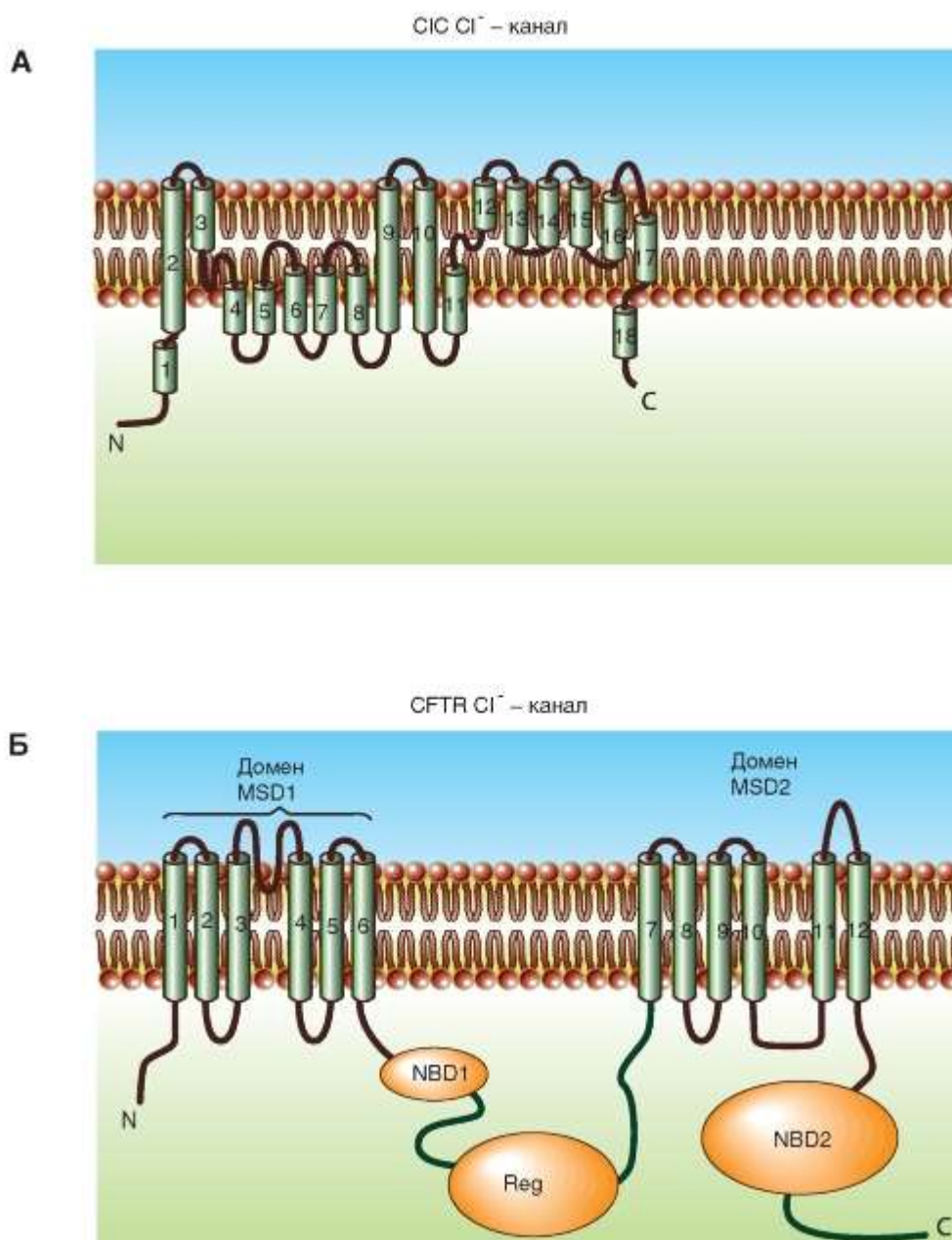
Cl⁻-канал

Потенциалуправляемые хлорные каналы ClC (рис. 1-21 А) были впервые клонированы в 1990 г. из электрического органа *Torpedo*. Эти клонированные каналы известны как ClC-0. Ген, кодирующий ClC-0, был впервые обнаружен в мозге млекопитающих и относится к большому суперсемейству, включающему минимум восемь гомологичных генов.

Хлорный канал CFTR (рис. 1-21 Б) представляет собой гликопротеин с двумя находящимися в мембране доменами MSD1 и MSD2, причем каждый состоит из 6 трансмембранных сегментов.

Рис. 1-21. Молекулярная организация двух различных Cl⁻-каналов.

А - потенциалуправляемые хлорные каналы ClC. Б - хлорный канал CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) эпителиальных клеток. В настоящее время он обнаружен в сердечных клетках



Механоуправляемые каналы

Механосенситивность представляет собой универсальное свойство практически всех клеток. Однако принцип передачи и преобразования механического стресса в ответную реакцию клетки до сих пор не ясен. Преобразование механического сигнала в клетке, по-видимому, должно реализовываться через:

- цитоскелет и его механохимические компоненты, такие, как актин и тубулин;
- клеточные поверхностные протеины, такие, как интегрины;

• механосенситивные ионные каналы (МСК). Из всех перечисленных структур, обеспечивающих механическую передачу в клетке, МСК наиболее просты в изучении, поскольку их ответ на механическое воздействие быстрый и легко оценивается. Наиболее важная информация относительно свойств МСК вначале была получена не от специальных механосенситивных клеток, а при изучении клеток, чья основная функция не связана с механочувствительностью. Это объясняется тем, что передача механического стресса в клетке тесно связана со структурными компонентами мембраны, натяжение которой они чувствуют, а получить изолированные клетки с неповрежденной мембраной достаточно сложно.

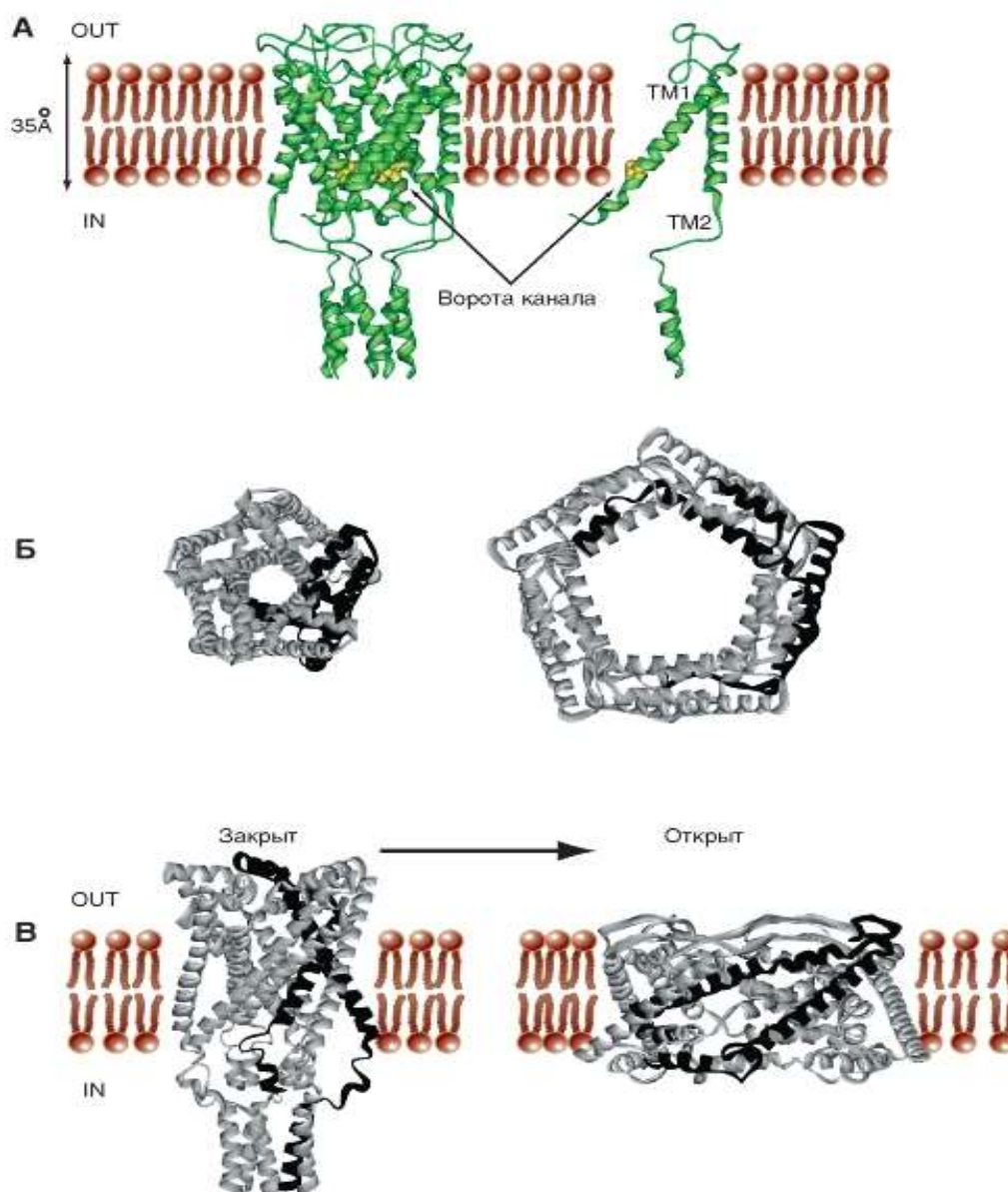
МСК отвечают на механический стресс мембраны изменением вероятности открытия канала. Эти каналы существуют в слуховых клетках, механорецепторах, мышечных веретенах, сосудистом эндотелии и нейросенсорной ткани, где их

физиологическая функция достаточно понятна. Однако менее понятно, почему электронеовозбудимые клетки, такие, как клетки крови и эпителиальные клетки, нуждаются в каналах, которые отвечают на механические стимулы. По-видимому, это связано с тем, что все клетки должны сталкиваться с проблемой регуляции объема и электролитного гомеостаза. Регуляция клеточного роста также требует специфической механопередающей системы, которая определяет физические изменения клеточных размеров и формы. Таким образом, нельзя исключить, что нерегулируемый рост, характерный для раковых клеток, связан с поломкой такой механопередающей системы.

Определение канала как механосенситивного эмпирическое и означает изменение вероятности открытия канала в ответ на механическую деформацию мембраны. Механочувствительность определяется каналами, активирующимися при растяжении клетки, - *stretch-activated channels* (SAC). Определено, что изменение проницаемости МСК происходит в ответ на натяжение (*tension*) мембраны, которое «чувствует» канал или окружающие его липиды или связанный с ним цитоскелет мембраны.

На рисунке 1-22 А показаны молекулярная организация канала, активирующегося при растяжении клетки (SAC), и два основных сегмента канала: трансмембранный сегмент 1 (TM1) и трансмембранный сегмент 2 (TM2). Затем (рис. 1-22 Б, В) в двух плоскостях показан SAC в закрытом и открытом состоянии, при этом определено расположение всех сегментов канала.

Рис. 1-22. Молекулярная организация механосенситивного канала



Водный канал

На рис. 1-23 А представлена схематическая диаграмма топологии единичной субъединицы аквапорина с точки зрения ее положения в мембране. Три пары трансмембранных гомологичных альфа-спиралей (А и А', Б и Б', С и С) ориентированы в противоположные стороны с точки зрения плоскости мембраны и соединяются двумя гидрофильными петлями, содержащими короткие не пересекающие мембрану спирали и аспарагиновые (N) остатки. Эти петли изгибаются, образуя пору, окруженную шестью трансмембранными спиралями, которые встречаются в центре, образуя часть водно-селективных ворот.

На рис. 1-23 Б продемонстрирована структурная модель белка-тетрамера, состоящего из четырех одинаковых субъединиц. Каждая субъединица образует водный канал как видно в этой проекции при взгляде сверху на белок с эктоплазматической стороны. Один из мономеров показан

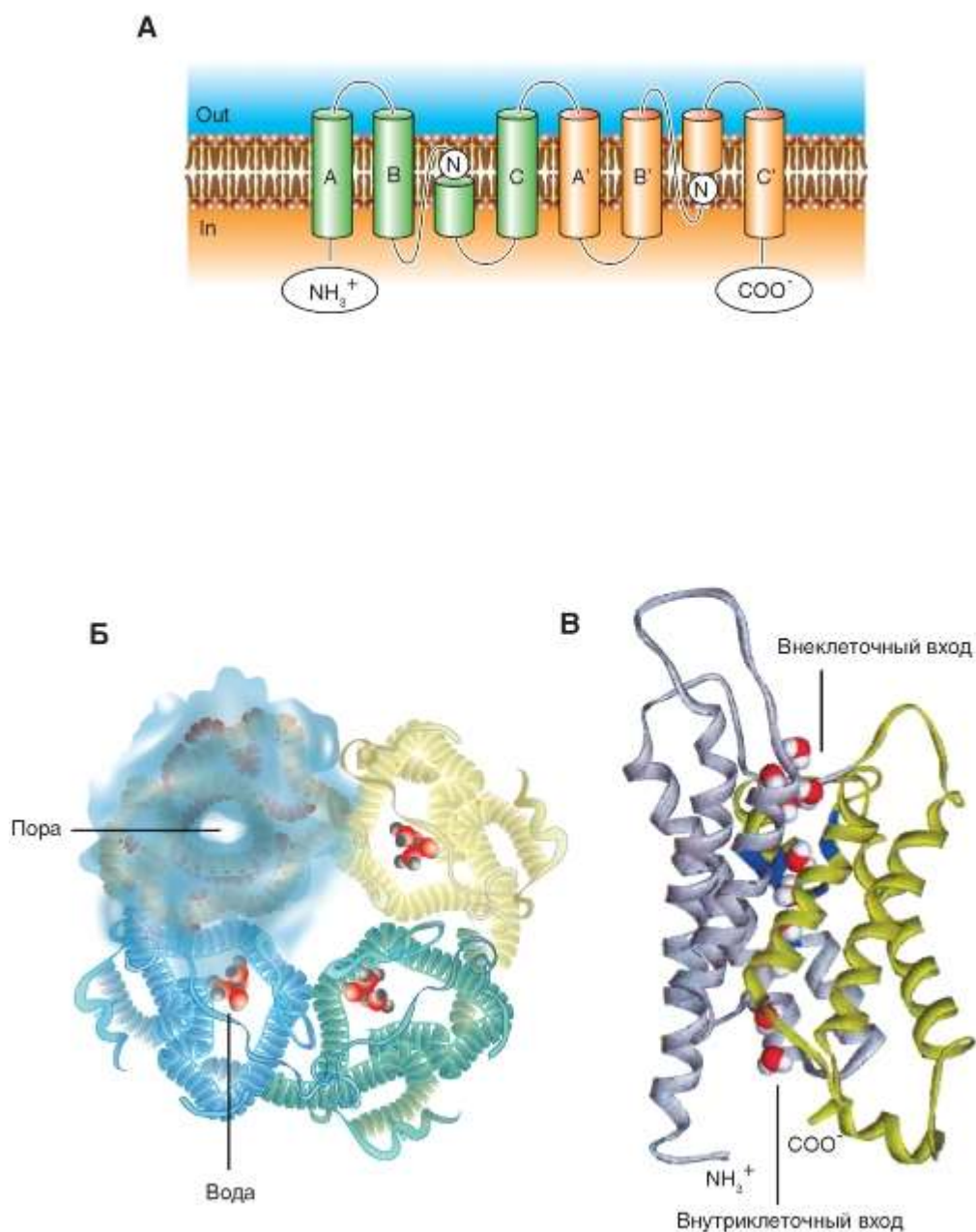
с молекулярной поверхностью в которой видна пора «вход» в устье канала.

На рис. 1-23 В показан вид поры сбоку в единичной аквапориновой единице в которой несколько молекул воды (кислород показан красным цветом и водород - голубым) видны

в 2 нанометровых водно-селективных воротах, которые отделяют отделы водосодержащего цитозоля клетки и внеклеточной среды. Ворота содержат высоко стабильные (консервативные с точки зрения последовательности) аргининовые и гистидиновые последовательности, и две аспарагиновые (голубой цвет) последовательности, чьи боковые цепи образуют водородные связи с транспортируемой водой (ключевые последовательности ворот изображены синим цветом). Транспортируемая вода так же образует водородные связи с карбонильными группами главной цепи цистеновой последовательности. Расположение этих водородных связей и узкий диаметр поры в 0.28 нанометра предотвращает прохождение через канал протонов (например H_3O^+) или других ионов.

Рис. 1-23. Молекулярная организация белка водного канала аквапорина.

А - планометрическая структура одной субъединицы аквапорина в мембране. Б - структурная модель белка-тетрамера. В - вид поры сбоку



Ионные насосы

АТФ-энергетические насосы определяют так называемый активный транспорт. Активный транспорт использует энергию для осуществления перемещения вещества через мембрану из области низкой концентрации в область высокой, т.е. против электрохимического градиента вещества. Активный транспорт требует связывания транспортируемого вещества с переносчиком мембраны. Поскольку эти переносчики перемещают вещество против градиента концентрации, они называются «насосами». Насосы, обеспечивающие активный транспорт, специфичны для транспортируемого вещества и насыщаемы, т.е. их поток максимален, когда все специфические места связывания с переносимым веществом заняты. Движение из области с более низкой концентрацией к области с более высокой и обеспечение поддержания установившейся концентрации на одной стороне мембраны могут быть достигнуты только непрерывным энергетическим обеспечением транспортного процесса. Эта энергия может:

- изменять аффинность центра связывания на транспортере так, чтобы аффинность связывания на одной стороне мембраны была более высокой, чем на другой;
- изменять скорости, с которыми центр связывания на переносчике сдвигается от одной поверхности до другой.

Активный транспорт должен быть связан с одновременным переходом некоторого источника энергии от более высокого энергетического уровня к более низкому энергетическому уровню. Для активного транспорта известно два варианта использования переносчиками энергии:

- прямое потребление АТФ в первично активном транспорте;
- использование градиента концентрации ионов относительно мембраны, созданного первично активным транспортом, для управления процессом вторично активного транспорта. Рассмотрим АТФ-энергетические насосы

(АТФазы), которые транспортируют ионы против их концентрационного градиента. Ионные насосы на основании особенностей их молекулярной организации могут быть сгруппированы в три класса (P, V и F). На рисунке 1-24 показаны их основные структуры, а свойства коротко суммированы в табл. 1-1. Все три класса АТФаз имеют одно или более мест связывания с АТФ на цитозольной поверхности мембраны.

Ионные насосы класса P самые простые по структуре и состоят из четырех трансмембранных полипептидных субъединиц - 2α и 2β . Большая α -субъединица фосфорилируется в течение процесса транспорта, сквозь нее перемещаются транспортируемые ионы.

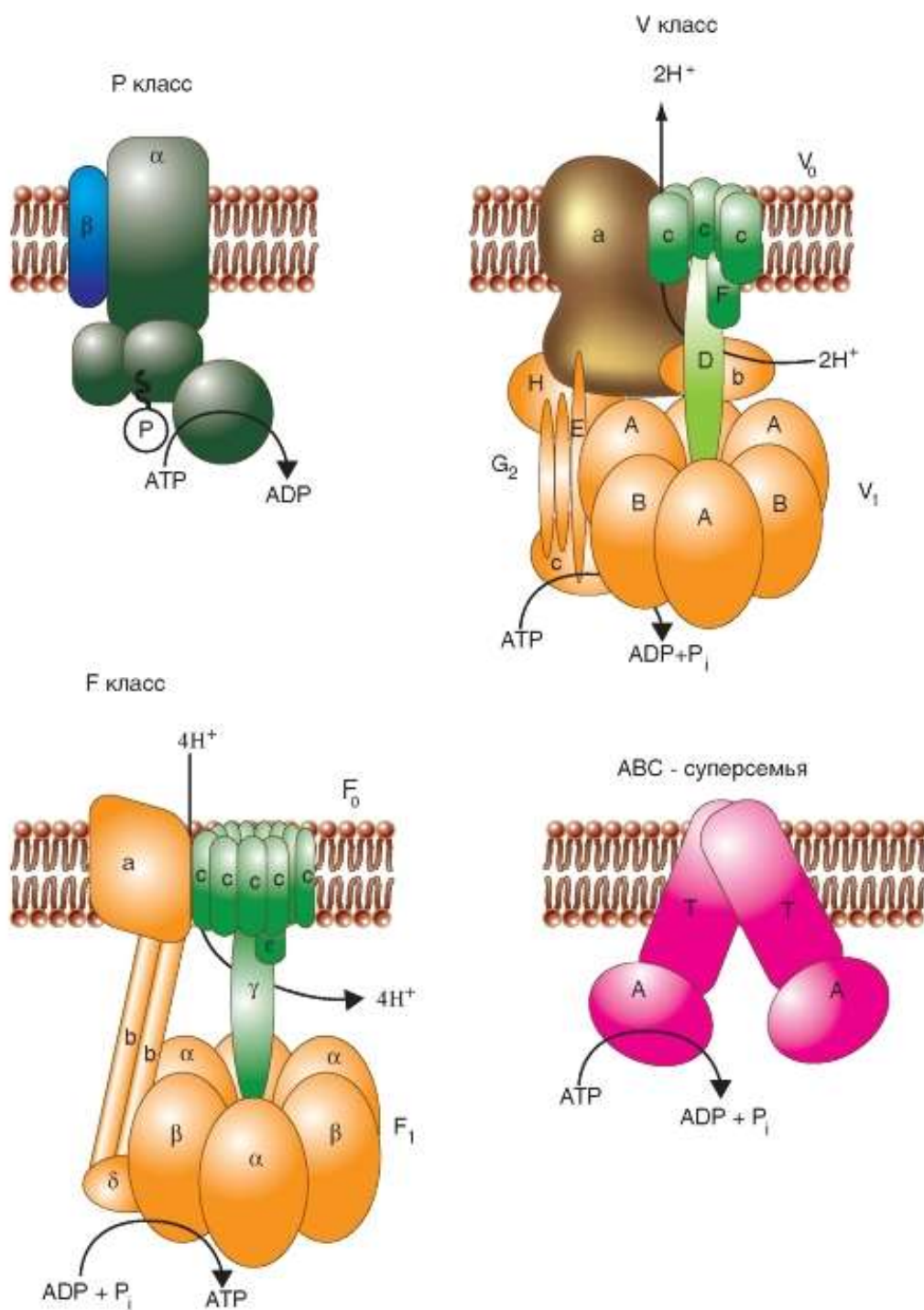
Первый тип насосов класса P - это несколько Ca^{2+} -АТФаз. Одна из Ca^{2+} -АТФаз расположена в плазматической мембране клетки и транспортирует ионы Ca^{2+} из клетки во внеклеточную среду. Другие Ca^{2+} -АТФазы расположены в мембране внутриклеточных структур, например саркоплазматическом ретикулуме мышечных клеток. Они транспортируют ионы Ca^{2+} из цитоплазмы в саркоплазматический ретикулум. Некоторые Ca^{2+} -АТФазы находятся в мембране ряда внутриклеточных органелл, в которые они транспортируют ионы Ca^{2+} . Благодаря работе Ca^{2+} -АТФаз концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме поддерживается на намного меньшем уровне, чем во внеклеточной среде.

Вторым типом насосов класса P служит насос, сопрягающий транспорт Na^+ и K^+ , который выкачивает три иона Na^+ из клетки, одновременно вводя два иона K^+ в клетку против его электрохимического градиента. Таким образом, возникнет негативный внутриклеточный потенциал мембраны клетки (потенциал покоя клетки). Такой электрогенный Na^+/K^+ -насос основан на Na^+/K^+ -АТФазе, расположенной исключительно в плазматической мембране клетки.

Третий тип насоса класса Р найден в некоторых секретирующих кислоту клетках. Он транспортирует протоны (ионы H^+) из клетки, а ионы K^+ в клетку.

Ионные насосы классов V и F сходны по структуре друг с другом, но не гомологичны с классом Р. Все известные типы этих двух классов насосов транспортируют только протоны. Насосы класса F включают, по крайней мере, три вида трансмембранных белков, а насосы класса V - два вида. Оба класса содержат как минимум пять видов внеклеточных полипептидов. Две трансмембранные субъединицы и две внешние субъединицы в насосах класса F гомологичны с такими же класса V.

Рис. 1-24. АТФ-энергетические насосы



Ca²⁺-АТФаза

Одним из типов класса Р является Ca²⁺-АТФаза, часто называемая Ca²⁺-насосом. Молекулярная организация Ca²⁺-АТФазы показана на рис. 1-25 А. Она поддерживает концентрацию свободных ионов Ca²⁺ в пределах от 10⁻⁷ до 2х10⁻⁷ М. Необходимо отметить, что не все цитозольные ионы Ca²⁺ свободны. Некоторые из них связаны с отрицательными зарядами молекул фосфатов, оксалатов или АТФ. Но главным для работы клетки служит концентрация свободных несвязанных ионов Ca²⁺. У большинства клеток эукариотов Ca²⁺-ЛТФаза, локализованная в плазматической мембране клеток, транспортирует Ca²⁺ из клетки против его концентрационного градиента, поскольку внеклеточная концентрация Ca²⁺ равна примерно 3х10⁻³ М. Мышечные клетки содержат вторую, отличающуюся Ca²⁺-АТФазу, транспортирующую Ca²⁺ из цитозоля в полость саркоплазматического ретикулума, внутриклеточной структуры, которая накапливает и хранит ионы Ca²⁺. Саркоплазматический ретикулум и его Ca²⁺-насос очень важны для сокращения и релаксации мышц. Освобождение ионов Ca²⁺ из саркоплазматического ретикулума в цитозоль мышечной клетки вызывает сокращение, а быстрое удаление ионов Ca²⁺ из цитозоля Ca²⁺-насосом - расслабление мышц.

Принцип работы Ca²⁺-АТФазы показан на рис. 1-25 Б.

Кальциевый насос в мышцах

Одиночный трансмембранный α-полипептид с молекулярной массой 100 000 обладает активностью Ca²⁺-АТФазы и транспортирует два иона Ca²⁺ при гидролизе одной молекулы АТФ до АДФ, причем для формирования комплекса с АТФ необходим Mg²⁺. (В большей части ферментативных реакций, в которых АТФ играет роль донора фосфата, участвует активная форма АТФ, а именно - комплекс Mg²⁺-АТФ.) Функции и даже существование β-субъединицы спорны. Крайне высокая аффинность центров связывания этого фермента для ионов Ca²⁺ (K_m=10⁻⁷ М) на поверхности, обращенной в цитозоль, позволяет ему очень эффективно связывать и транспортировать Ca²⁺ из цитозоля, где концентрация свободного Ca²⁺ находится в диапазоне от 10⁻⁷ М (покоящиеся клетки) до более чем 10⁻⁶ М (сокращающаяся клетка), в полость саркоплазматического ретикулума, где общая концентрация Ca²⁺ может быть высокой, достигая 10⁻² М. Активность мышечной Ca²⁺-АТФазы регулируется концентрацией свободного Ca²⁺. Если эта концентрация становится слишком высокой, скорость закачивания Ca²⁺ увеличивается до тех пор, пока его концентрация не станет меньше чем 10⁻⁶ М.

Концентрация свободного Ca²⁺ внутри саркоплазматического ретикулума значительно меньше, чем его общая концентрация, максимально равная 10⁻² М. Два растворимых протеина в полостях везикул саркоплазматического ретикулума связывают ионы Ca²⁺. Один, кальсеквестрин (*calsequestrin*) (молекулярная масса 44 000), с сильно выраженными кислотными свойствами: 37% его остатков это аспарагиновая и глутаминовая кислоты. Каждая молекула кальсеквестрина связывает 43 иона Ca²⁺ с величиной K_m, примерно равной 1х10⁻³ М. Второй - высокоаффинный Са-связывающий протеин, - имеет более низкую «валентность» для ионов Ca²⁺, но высокую аффинность (K_m=3х10⁻⁶-4х10⁻⁶ М) по сравнению с кальсеквестрином. Такие протеины работают как резервуары для внутриклеточного Ca²⁺, снижая концентрацию свободных ионов Ca²⁺ в везикулах саркоплазматического ретикулума и соответственно уменьшая энергию, необходимую для закачивания ионов Ca²⁺ внутрь этих везикул из цитозоля.

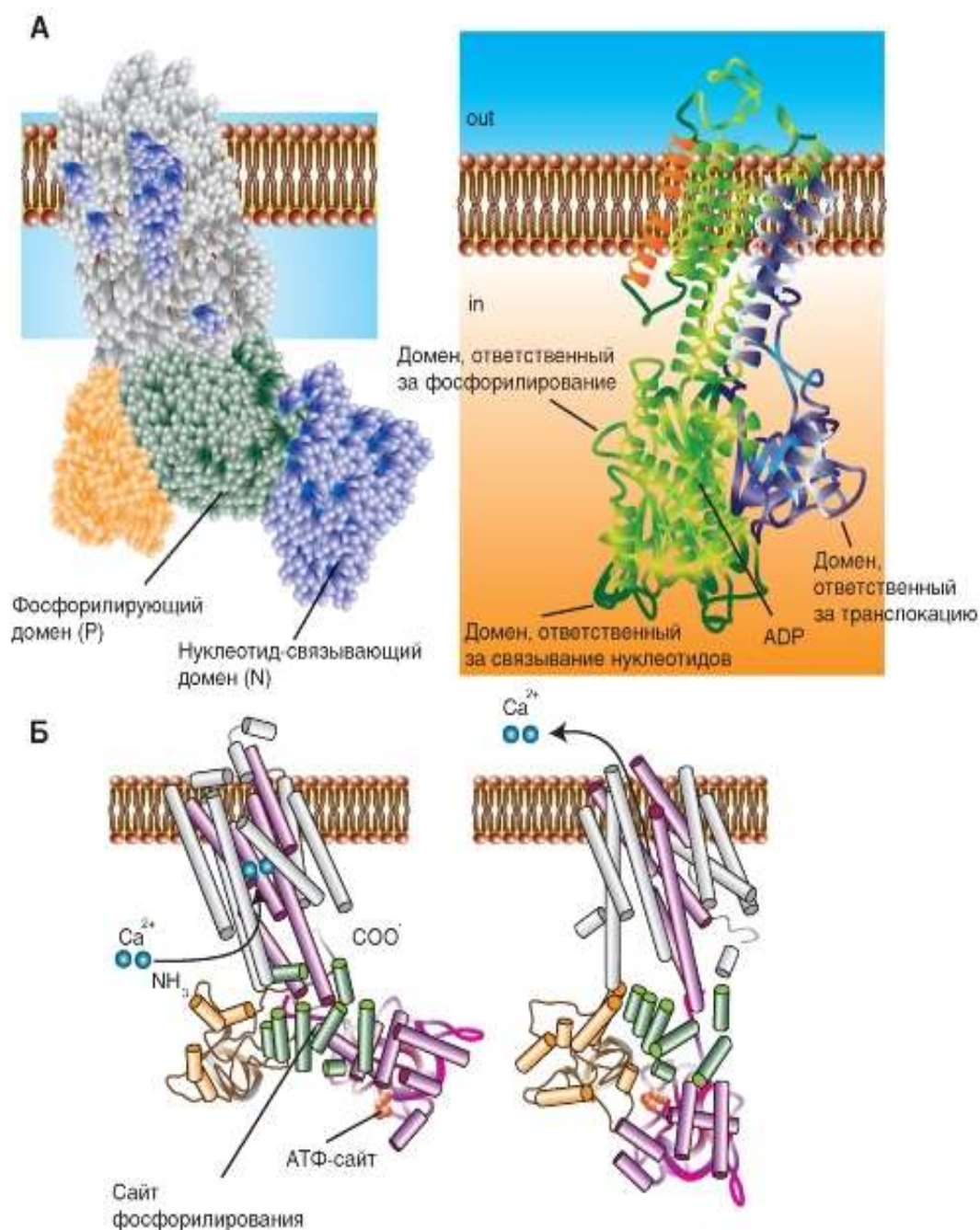
Кальциевый насос в плазматической мембране

Плазматическая мембрана животных, дрожжевых и, возможно, растительных клеток содержит Ca²⁺-АТФазы, транспортирующие ионы Ca²⁺ из цитозоля во внеклеточный раствор. Во многих случаях активность этих ферментов стимулируется повышением в цитозоле свободного Ca²⁺, вызванного, например, гормональной стимуляцией. Связывающий

кальций регуляторный протеин кальмодулин (*calmodulin*) - существенная субъединица Ca^{2+} -АТФазы эритроцита и других Ca^{2+} -АТФаз плазматической мембраны. Подъем цитозольного Ca^{2+} приводит к связыванию ионов Ca^{2+} с кальмодулином, запускающим аллостерическую активность Ca^{2+} -АТФазы. Как результат этого экспорт ионов Ca^{2+} из клетки ускоряется, и восстанавливается исходно низкая концентрация свободного Ca^{2+} в цитозоле (примерно $1 \times 10^{-6} \text{ M}$).

Рис. 1-25. Молекулярная организация Ca^{2+} -АТФазы.

А - молекулярная организация. Б - проведение ионов Ca^{2+} через молекулу Ca^{2+} -АТФазы



Работа Ca^{2+} -АТФазы на молекулярном уровне

На предыдущем рисунке основное внимание уделялось структуре Ca^{2+} -АТФазы. На рис. 1-26 представлен цикл работы насоса этого типа с позиций изменения конформаций отдельных доменов Ca^{2+} -АТФазы. В виде схематических блоков на рисунке представлены нуклеотид-связывающий домен (NB), домен, ответственный за фосфорелирование (P), и структура, обеспечивающая транслокацию (ТА) - проталкивание двух ионов Ca^{2+} на другую сторону протеина и соответственно мембраны.

Цикл можно описывать со структуры насоса, связанного с АДФ. В этом состоянии 2 иона Ca^{2+} изолированы в пределах мембранного региона насоса. Гипотетическая последовательность структурных изменений ассоциируется с транслокацией Ca^{2+} кальциевым насосом. В основе транслокации лежат процессы фосфорилирования и дефосфорилирования которые вызывают конформационные изменения (показанные стрелками), в результате чего происходит перемещение 2 ионов Ca^{2+} через мембрану.

Когда протеин находится в исходной конформации два иона Ca^{2+} по очереди связываются с высокоаффинными участками поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля. Затем АТФ связывается с другим определенным участком поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля. Одновременное присутствие ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} -АТФ запускает гидролиз АТФ. При этом освобожденный фосфат (концевая фосфатная группа в АТФ) переносится от АТФ к карбоксильной группе остатка аспарагиновой кислоты протеина (фосфорилирование белка по карбоксильной группе аспарагиновой кислоты), формируя высокоэнергетическую ацилфосфатную связь. Происходит образование фосфорилированного протеина (или ферментфосфатного комплекса). Это изменение конформации протеина ведет к одновременному проталкиванию двух ионов Ca^{2+} на другую сторону протеина и соответственно мембраны.

Рис. 1-26. Молекулярный механизм работы Ca^{2+} -АТФазы.

Обозначения: NB - домен, ответственный за связывание нуклеотидов; P - домен, ответственный за фосфорилирование; ТА - домен, ответственный за транслокацию

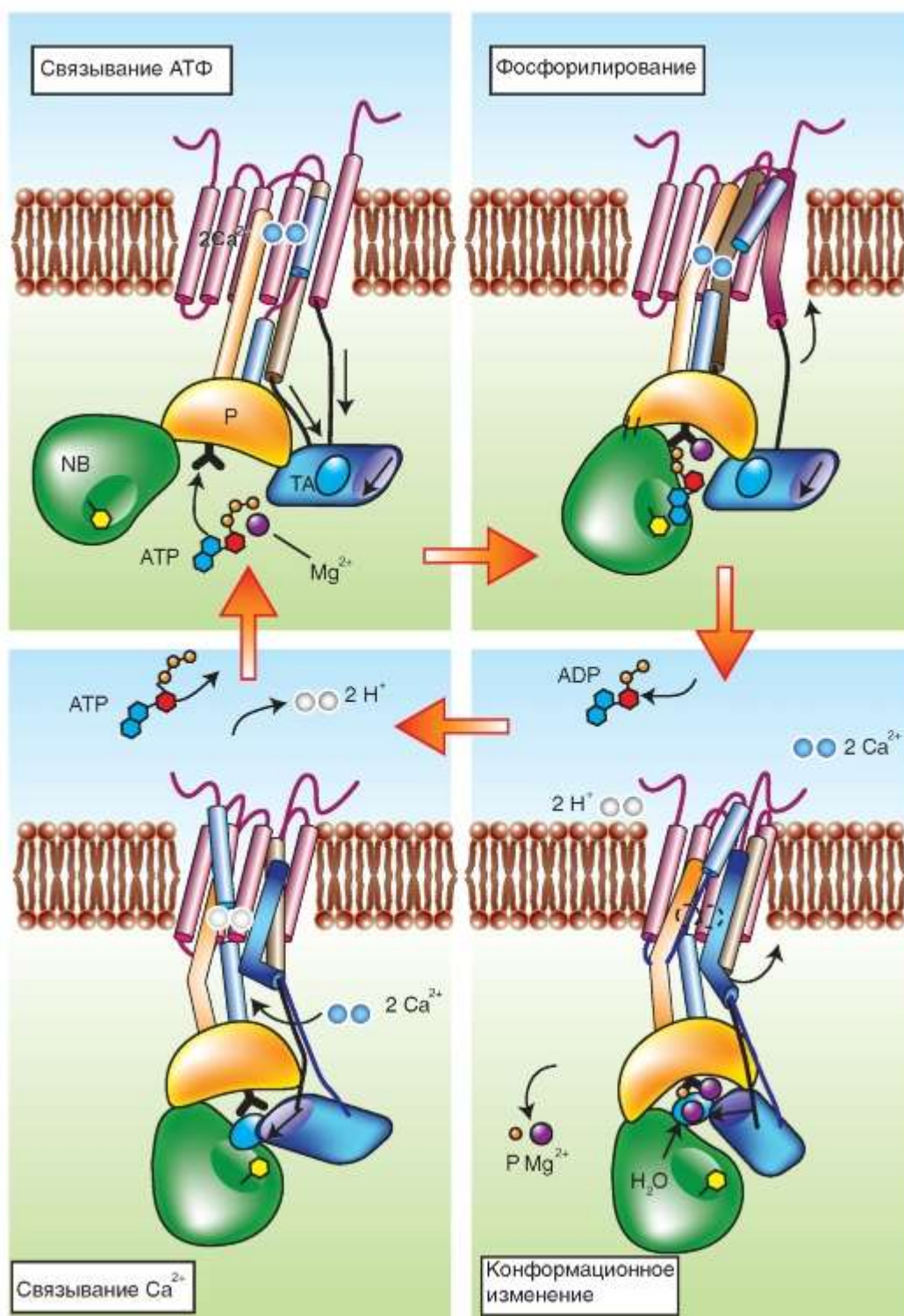


Схема работы Ca^{2+} -АТФазы

Когда протеин находится в исходной конформации E1, сначала один и затем второй ион Ca^{2+} связываются с высокоаффинными ($K_m=10^{-7}$ M) участками поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля (этап 1). Ионы Mg^{2+} не влияют на связывание ионов Ca^{2+} , поскольку сродство к Ca^{2+} у центров связывания в 30 тыс. раз выше, чем у Mg^{2+} .

После связывания ионов Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФ связывается с другим определенным участком поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля ($K_m=2 \times 10^{-5}$ M) (этап 2). В интактной клетке лишь очень незначительное количество АТФ и АДФ содержится в

виде свободных анионов. В основном эти соединения представлены комплексами Mg^{2+} -АТФ и Mg^{2+} -АДФ. При этом сродство Mg^{2+} к АТФ в 10 раз превышает сродство к АДФ.

Таким образом, оба лиганда (ионы Ca^{2+} и комплекс Mg^{2+} -АТФ) присоединены к разным центрам на поверхности молекулы протеина, обращенной в сторону цитозоля. Низкое значение K_m ионов Ca^{2+} ($K_m=10^{-7}$ М) свидетельствует о том, что даже при низкой концентрации ионов Ca^{2+} значительная часть их будет связана с насосом.

Одновременное присутствие на своих местах ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} -АТФ (этап 3) запускает следующий этап - гидролиз АТФ. При этом освобожденный фосфат (концевая фосфатная группа в АТФ) переносится от АТФ к карбоксильной группе остатка аспарагиновой кислоты протеина (фосфорилирование белка по карбоксильной группе аспарагиновой кислоты), формируя высокоэнергетическую ацилфосфатную связь. Происходит образование фосфорилированного протеина (или ферментфосфатного комплекса), отмеченного как $E1\sim P$ (этап 4А). На этом этапе, однако, возможно обратное преобразование АДФ в АТФ. Константа K_m образовавшегося АДФ с ферментфосфатным комплексом ($E1\sim P$) составляет примерно 5×10^{-5} М и практически совпадает с константой K_m связывания АТФ с ферментом ($K_m=2 \times 10^{-5}$ М). Свободная энергия гидролиза АТФ (около 40 кДж на 1 М) потрачена на образование комплекса $E1\sim P$ (фосфорилирование фермента) с высокоэнергетической ацилфосфатной связью (символ « $\sim P$ » обозначает высокоэнергетическую ацилфосфатную связь). Таким образом, связь фосфата в фосфорилированном белке также богата энергией, которая высвобождается при ее гидролизе.

Фосфорилирование протеина запускает преобразование $E1$ в $E2$. (Протеин меняет свою конформацию, и это дает возможность обозначить комплекс как $E2\sim P$, подразумевая, что $E2$, по сравнению с $E1$, имеет другую конформацию.) Процесс изменения конформации протеина происходит мгновенно после его фосфорилирования, поэтому мы выделяем его в этап 4Б для лучшего понимания процесса.

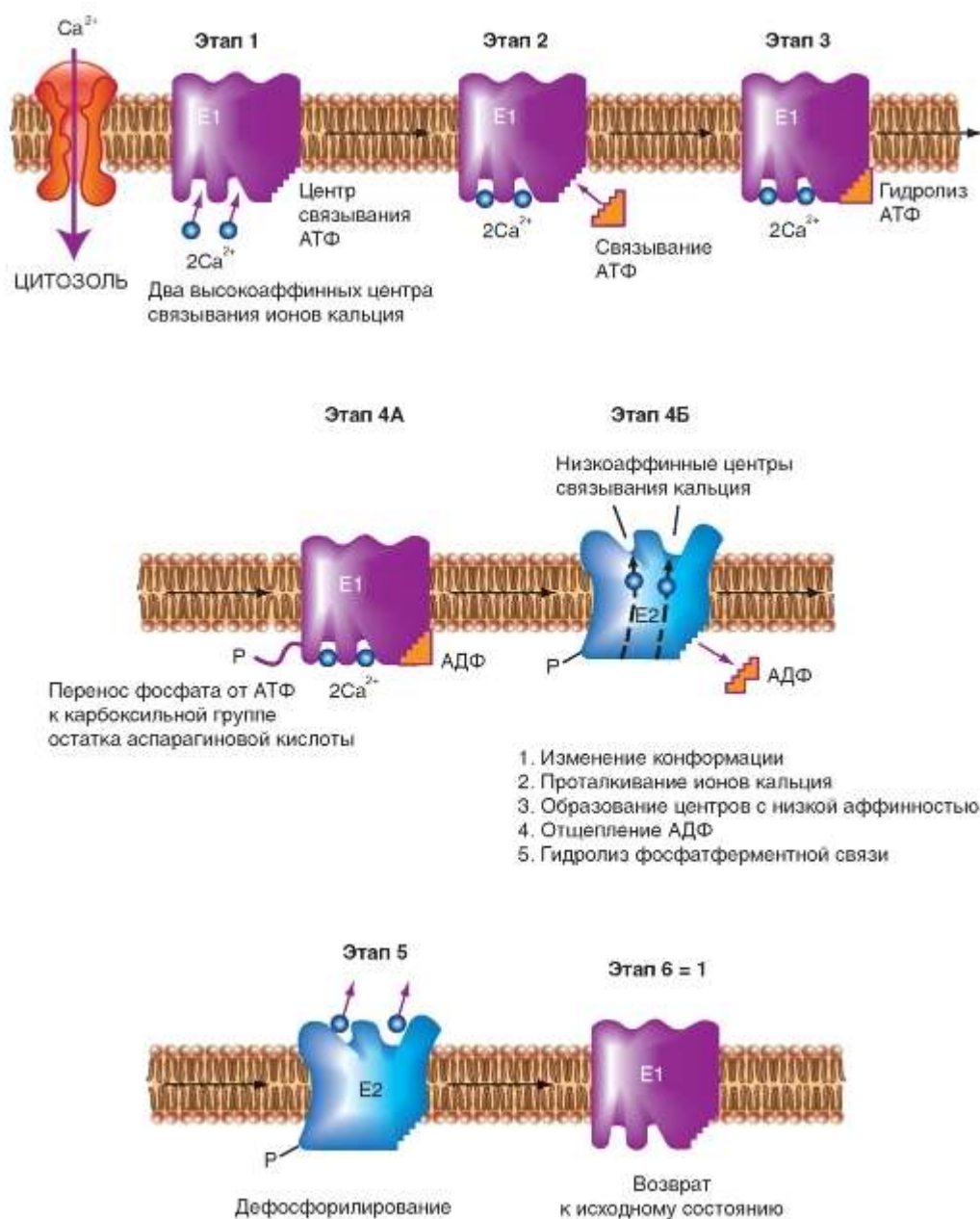
Это изменение конформации протеина ведет к одновременному проталкиванию двух ионов Ca^{2+} на другую сторону протеина и соответственно мембраны (транслокация). При переходе двух ионов Ca^{2+} высокоэнергетическая ацилфосфатная связь теряет макроэргическую энергию. Она превратилась в изменение сродства к Ca^{2+} (на четыре порядка). В результате этого изменения энергии фосфатной связи из АДФ уже не получить АТФ. Эта конформация протеина уже не имеет центров с крайне высокой аффинностью для ионов Ca^{2+} на поверхности фермента, обращенной в цитозоль. При транслокации ионов к поверхности протеина, которая смотрит в полость саркоплазматического ретикулула, образуются два центра связывания со слабой аффинностью для ионов Ca^{2+} . Одновременно с проталкиванием ионов Ca^{2+} через протеин в результате изменения конформации белка происходит отщепление АДФ.

Переход ионов на другую сторону протеина не завершает процесс. Необходима энергия, чтобы ионы оторвались от центров связывания. Она также обусловлена гидролизом АТФ. В результате гидролиза образуется комплекс $E1\sim P$ с макроэргической фосфатной связью, а само высвобождение энергии происходит в результате изменения характера связи фосфатной группы с ферментом (т.е. перехода $\sim P$ в $-P$). Эта энергия, ранее сосредоточенная в макроэргической фосфатной связи, расходуется и на изменение константы связывания ионов Ca^{2+} с ферментом. Константа K_m становится равной примерно 10^{-3} М. С энергетической точки зрения это означает изменение энергии связывания, т.е. два иона Ca^{2+} уходят от поверхности протеина (этап 5).

Естественно, что для повторения цикла необходимо еще одно конформационное изменение протеина. Дефосфорилирование завершает переход $E2$ в $E1$. Изменение конформации вызывает образование высокоаффинных центров связывания с ионами Ca^{2+} на поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля. Низкоаффинные центры

связывания с Ca^{2+} на противоположной стороне протеина в этой конформации отсутствуют (этап 6 = 1).

Рис. 1-27. Схема механизма работы Ca^{2+} -АТФазы



Na^+/K^+ -АТФаза

Второй тип насосов класса Р, который был изучен в деталях, это Na^+/K^+ -АТФаза, присутствующая в плазматических мембранах (рис. 1-28 А). Она была растворена и очищена от мембранной фракции нескольких типов клеток животных, например клеток почек млекопитающих и электрических органов угря (тканей, очень богатых этим ферментом). Этот ионный насос представляет собой тетрамер $2\alpha 2\beta$. Полипептид β (молекулярная масса 50 000) представляет собой трансмембранный гликопротеин, необходимый для того, чтобы заново синтезируемая α -субъединица свернулась должным образом. Но полипептид β , очевидно, не вовлекается напрямую в перенос ионов. Субъединица α (молекулярная масса 120 000) - это полипептид, у которого

аминокислотная последовательность и предсказанная структура в мембране очень сходны с таковыми у Ca^{2+} -АТФазы саркоплазматического ретикулула в мышце. В частности, Na^+/K^+ -АТФаза имеет «стебель» на цитозольной стороне, с которым связаны домены, содержащие связывающие АТФ участки и фосфорилированный аппарат. Общий процесс транспортного движения трех свободных ионов натрия из клетки и двух ионов калия в клетку на молекулу АТФ продемонстрирован на (рис. 1-28 Б).

Экспериментальные результаты свидетельствуют о том, что Na^+/K^+ -АТФаза ответственна за взаимосвязанное движение ионов натрия и калия из клетки и в клетку. Например, четкая взаимосвязь между током ионов натрия и калия через плазматическую мембрану и активность Na^+/K^+ -АТФазы наблюдалась в мембране различных тканей. Кроме того, вещество оуабаин, связывающее со специфическим регионом на эктоплазматической поверхности протеина, специфически ингибирует Na^+/K^+ -АТФазу, а также предотвращает поддержание натриево-калиевого баланса клетками.

Механизм действия Na^+/K^+ -АТФазы подобен механизму Ca^{2+} -АТФазы. Полный механизм переноса включает в себя несколько этапов работы, которые проходят в определенной последовательности, представленной на схеме (рис. 1-28 В).

На схеме показаны общие особенности механизма переноса. На внутриклеточной стороне мембраны Na^+/K^+ -АТФаза находится в конформации, называемой Е1. Эта конформация имеет специфические катионсвязывающие центры, имеющие высокую аффинность и к ионам Na^+ , и к АТФ (приблизительно $0,2 \times 10^{-6}$ М). Внутри клетки три иона Na^+ связываются с белком в конформации Е1, предварительно связанным с Mg^{2+} -АТФ с образованием комплекса $[\text{E1ATP3Na}^+]$. Связывание ионов Na^+ способствует фосфорилированию. Фосфорилирование переводит белок в форму Е1Р. В ней он может быть дефосфорилирован АДФ в обратимой реакции, описанный как обмен $\text{АТФ} \leftrightarrow \text{АДФ}$. Однако, когда АДФ уходит, ионы Na^+ , связанные с ферментом, остаются в нем «запечатаны» в форме $[\text{E1P(3Na}^+)]$. Стехиометрическое «запечатывание» транспортируемых ионов - ключевой аспект активного катионного транспорта. Именно в таком виде в белке происходит конформационный переход, определяющий перенос ионов на противоположную сторону мембраны. Ионы Na^+ покидают белок на внеклеточной поверхности (первый ион более быстро, а второй и третий более медленно), и ферментфосфатный комплекс $[\text{E2P}]$ больше не чувствителен к добавлению АДФ, но чувствителен к водному гидролизу. Эта форма белка в виде $[\text{E2P}]$ связывает два иона K^+ на внешней поверхности с образованием комплекса $[\text{E2P2K}^+]$. Связывание ионов приводит к дефосфорилированию фермента. На внутренней поверхности P_i освобождается, и ионы K^+ становятся «запечатанными» $[\text{E2(2K}^+)]$, чтобы осуществился перенос. Освобождение ионов K^+ во внутриклеточный раствор должно катализироваться АТФ, связывающейся с местом с низкой аффинностью (приблизительно 150×10^{-6} М) с образованием комплекса $[\text{E2ATP(2K}^+)]$. Фермент возвращается из Е2 к форме Е1 с низкой аффинностью к ионам K^+ $[\text{E1ATP(2K}^+)]$ (процесс, управляемый разницей в энергии связывания для АТФ). Ионы K^+ покидают комплекс на внутренней поверхности, в результате чего образуется комплекс $[\text{E1ATP}]$. Теперь белок готов начать новый цикл.

Рис. 1-28. Молекулярная организация Na^+/K^+ -АТФазы.

А - молекулярная организация Ca^{2+} -АТФазы. Б - принцип работы Na^+/K^+ -АТФазы. В - общие представления о механизме переноса

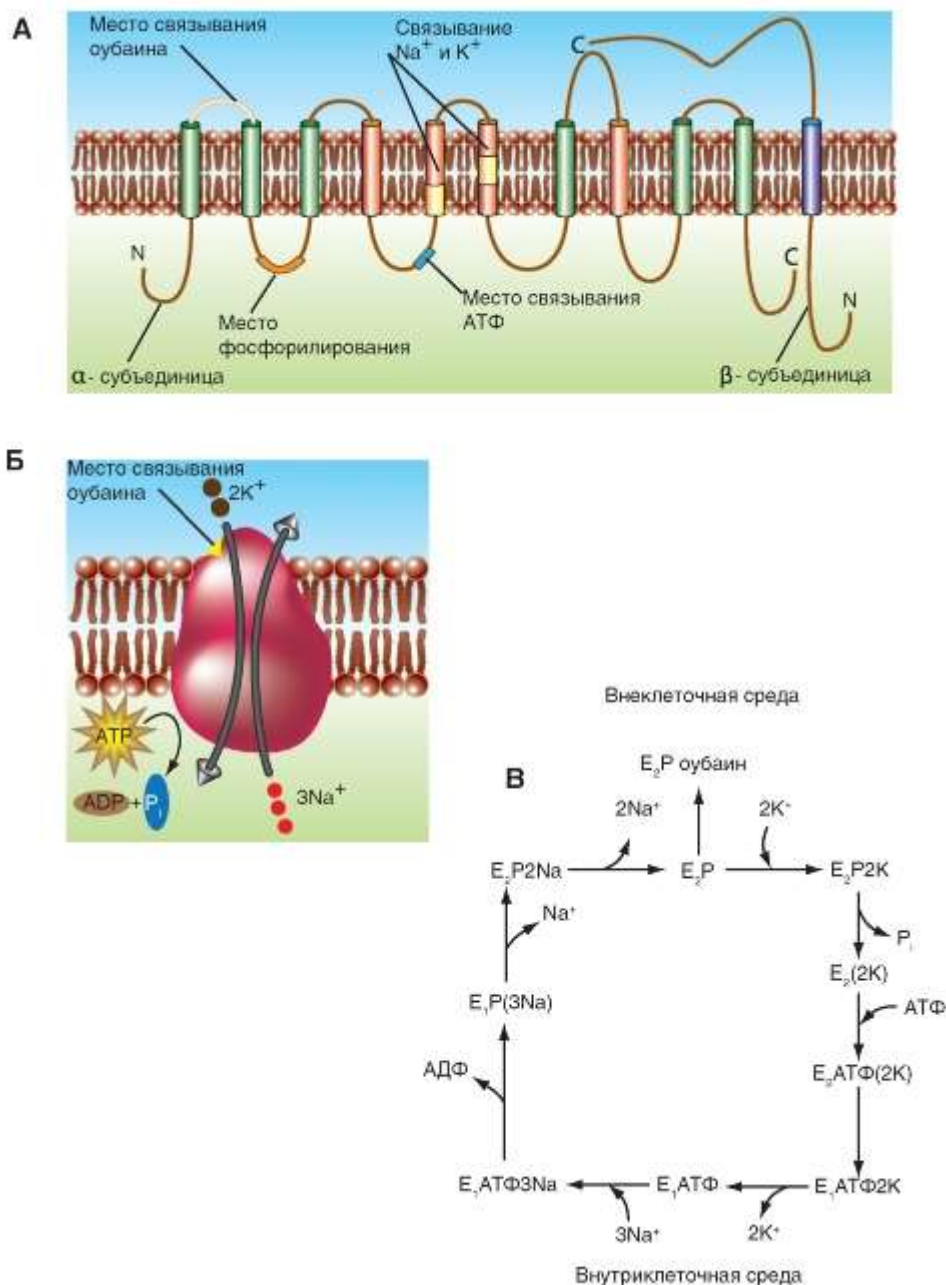


Схема работы Na^+/K^+ -АТФазы

В виде схемы молекулярный механизм работы Na^+/K^+ -АТФазы представлен на рис. 1-29. Рассмотрим его детально. Когда протеин находится в исходной конформации, называемой E_1 , его сторона, обращенная в цитозоль, имеет три высокоаффинных места для связывания ионов Na^+ . При этом другой определенный участок поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля, уже связан с Mg^{2+} -АТФ (этап 1). Сначала один, а затем второй и третий ионы Na^+ связываются с высокой аффинностью с определенными участками поверхности протеина, обращенной в сторону цитозоля (этапы 2 и 3). Константа связывания K_m для Na^+ этими центрами связывания равна $0,6 \times 10^{-3} \text{ M}$, и эта величина значительно меньше, чем внутриклеточная концентрация Na^+ ($\approx 12 \text{ mM}$). Это подчеркивает, что в норме ионы Na^+ должны заполнять центры связывания (этап 3).

Одновременное присутствие на своих местах связывания ионов Na^+ и Mg^{2+} -АТФ (этап 3) запускает следующий этап - гидролиз АТФ (этап 4). Связанный с протеином Mg^{2+} -АТФ гидролизуется до АДФ, а освобожденный фосфат (концевая фосфатная группа

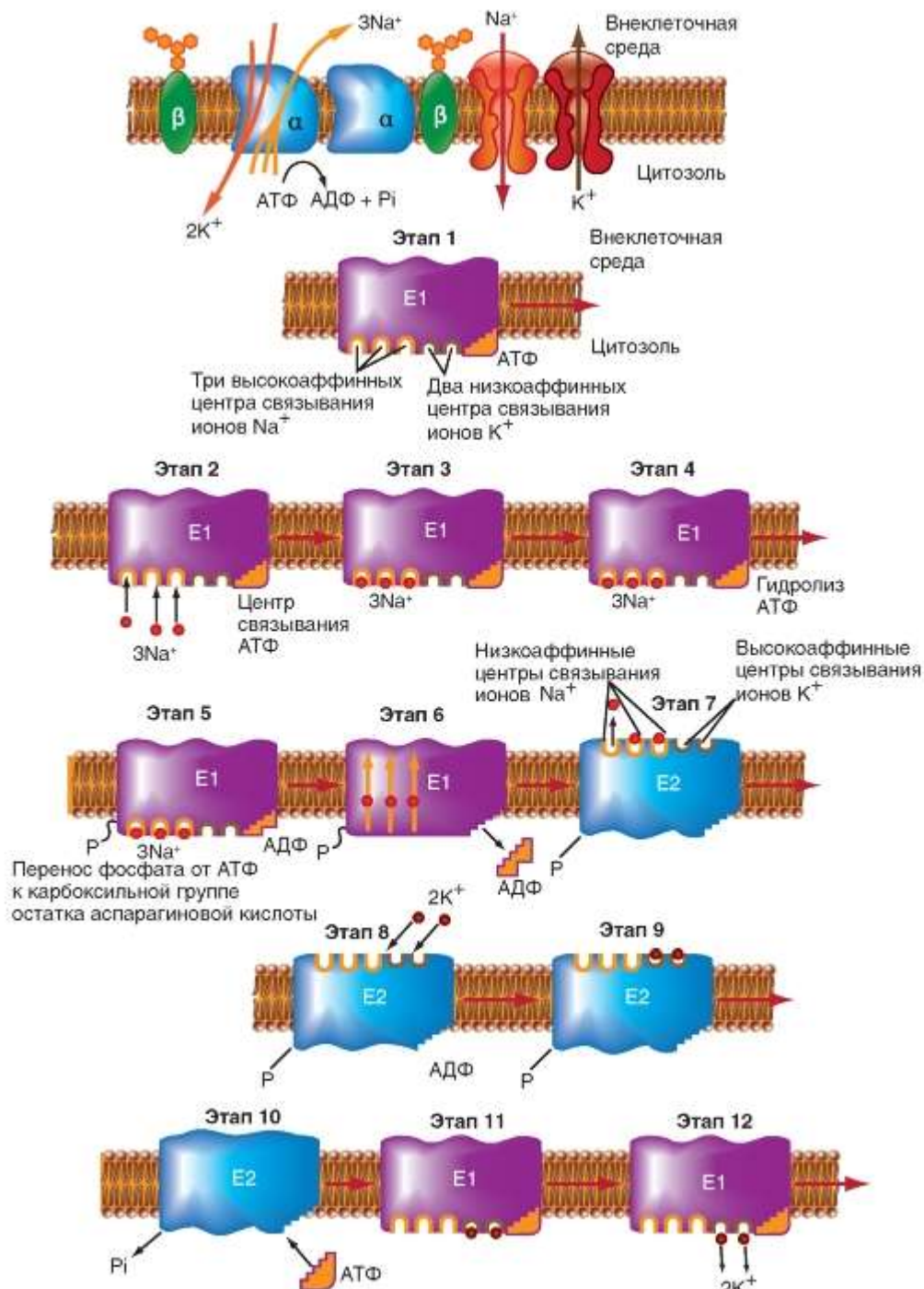
в АТФ) переносится от нее к карбоксильной группе остатка аспарагиновой кислоты протеина (фосфорилирование белка по карбоксильной группе аспарагиновой кислоты), формируя высокоэнергетическую ацилфосфатную связь, в результате чего происходит образование фосфорилированного протеина (или ферментфосфатного комплекса), отмеченного как $E1 \sim P$ (этап 5). Далее отщепляется АДФ, и одновременно проталкиваются три иона натрия (этап 6). В белке происходит конформационный переход (от $E1$ к $E2$), определяющий перенос ионов и центров связывания на противоположную сторону мембраны, причем там ионы Na^+ имеют низкоаффинную связь с центрами связывания. Далее на внеклеточной поверхности сначала один ион Na^+ быстро покидает белок (этап 7), а затем, более медленно, два других (этап 8).

Одновременно с транслокацией ионов натрия на внеклеточную сторону белка переходят центры связывания для ионов K^+ , причем транслокация приводит к тому, что эти центры приобретают высокую аффинность для ионов K^+ (этап 7). Именно с ними (этап 8 и 9) связываются два иона K^+ . K_m для связывания ионов K^+ в этих местах равна примерно 0,2 мМ. Это значительно меньшая величина, чем внеклеточная концентрация ионов K^+ (2×10^{-4} мМ). Это подчеркивает, что данные места будут заполнены ионами K^+ (этап 8 и 9). На внутренней поверхности P_i освобождается, и ионы K^+ «запечатываются», в результате чего осуществляется перенос (этап 10), и два связанных иона K^+ движутся через протеин и становятся соединенными с низкоаффинными центрами связывания на цитозольной стороне. Далее АТФ связывается с местом с низкой аффинностью (приблизительно 150×10^{-6} М) с образованием комплекса (этап 11). При этом одновременно происходит изменение конформации протеина $E2$ в $E1$. Связывание АТФ способствует освобождению ионов K^+ во внутриклеточную среду (этап 12). После этого ионы K^+ диссоциируют в цитозоль, и протеин готов начать новый цикл.

Коэффициент сопряжения удаляемых ионов Na^+ и поступающих ионов обычно равен трем к двум, т.е. насос является электрогенным, и его работа вызывает возникновение трансмембранной разности потенциалов, причем потенциал внутри клетки становится более отрицательным, чем он был бы без учета работы насоса, исходя только из градиентов концентраций ионов и относительных проницаемостей мембраны или только диффузионного потенциала. В нормальных условиях вклад потенциала, создаваемого Na^+/K^+ -насосом, составляет несколько милливольт.

Блокада Na^+/K^+ -АТФазы первое время незначительно влияет на потенциал покоя. Возникает небольшая деполяризация на 2-6 мВ, представляющая вклад V_p (потенциал насоса) в V_m (потенциал мембраны). Однако через несколько минут после блокады потенциал покоя медленно снижается вследствие постепенного уменьшения градиентов концентраций ионов. В результате увеличения деполяризации уменьшается скорость нарастания потенциала действия и, следовательно, скорость распространения возбуждения. В конце концов, происходит полная потеря возбудимости.

Рис. 1-29. Схема молекулярного механизма работы Na^+/K^+ -АТФазы



Обменники, транспортеры и ко-транспортеры

Вторично-активный транспорт отличается от первично-активного транспорта использованием градиента концентрации ионов относительно мембраны как источника энергии. Поток ионов от более высокой концентрации (более высокое энергетическое состояние) к более низкой концентрации (более низкое энергетическое состояние) обеспечивает энергию для движения активно транспортируемого вещества из области его низкой концентрации в область его высокой концентрации при вторично-активном транспорте. В дополнение к наличию центра связывания для активно транспортируемого вещества, транспортный белок во вторично-активной транспортной системе также имеет центр связывания для иона. Этот ион - часто Na⁺, но в некоторых случаях, это может быть

другой ион типа HCO_3^- , Cl^- или K^+ . Связывание иона со вторично-активным транспортером вызывает изменения в транспортере, а именно (1) изменение аффинности центра связывания на транспортере для транспортируемого вещества, или (2) изменения скорости, с которой центр связывания на транспортном белке перемещается от одной поверхности до другой. Обратите внимание, что при первично-активном транспорте транспортный белок изменен ковалентной модуляцией, как следствием ковалентной связи фосфата с транспортным белком; во вторично-активном транспорте, изменения вызваны аллостерической модуляцией в результате связывания иона.

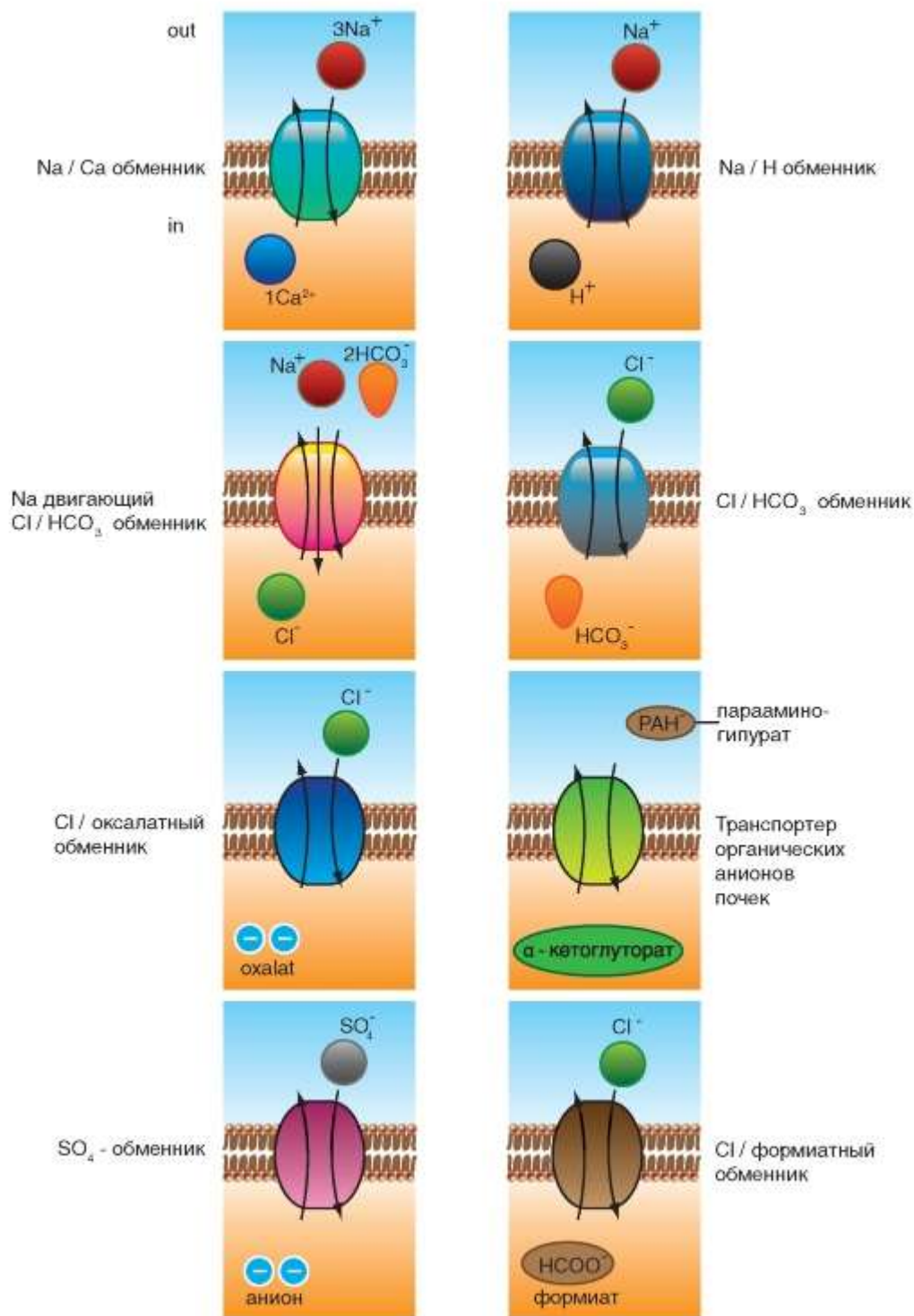
Имеется очень важная непрямая связь между вторично-активными транспортерами, которые используют Na^+ и первично-активным транспортером Na^+ - Na,K-ATPазой . Напомним, что внутриклеточная концентрация Na^+ намного ниже, чем внеклеточная концентрация Na^+ , потому что первично-активный транспорт Na^+ при помощи Na,K-ATPазы выносит Na^+ из клетки. Из-за низкой внутриклеточной концентрации Na^+ , немногие центры связывания Na^+ на вторичноактивном транспортном белке заняты на внутриклеточной поверхности транспортера. Это различие обеспечивает основание для асимметрии в транспортных потоках, ведя к движению против градиента концентрации транспортируемого вещества. В то же самое время, ион Na^+ , который связывается с транспортером на внеклеточной поверхности движется по градиенту концентрации в клетку, когда меняется конформация транспортера.

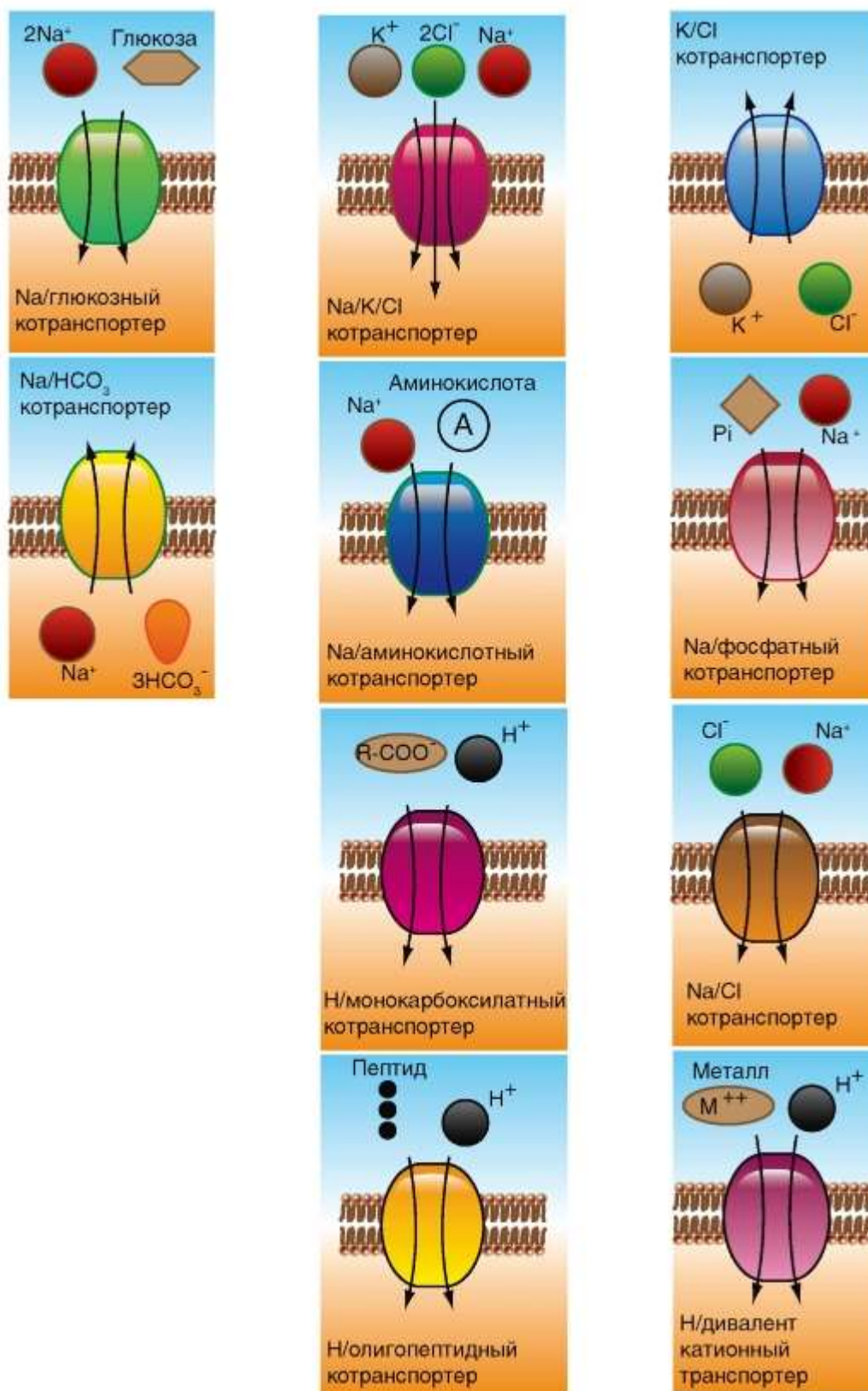
В целом, создание градиента концентрации Na^+ через плазматическую мембрану первичноактивным транспортом Na^+ означает не прямое «сохранение» энергии, которая может затем быть использована, чтобы управлять вторично-активными транспортными системами, связанными с Na^+ . В конечном счете, энергия для вторичноактивного транспорта получена от АТФ, который используется Na,K-ATPазой , чтобы создать градиент концентрации Na^+ . Если бы продукция АТФ была бы ингибирована, первично-активный транспорт Na^+ прекратился бы, и клетка больше не была бы способна поддерживать градиент концентрации Na^+ относительно мембраны. Это, в свою очередь, вело бы к отказу работы вторичноактивных транспортных систем, которые зависят от градиента Na^+ , как источника энергии. От 10% до 40% АТФ, синтезированной клеткой в условии покоя используется Na,K-ATPазой , чтобы поддерживать градиент Na^+ , который в свою очередь управляет множеством вторично-активных транспортных систем.

Движение натрия вторично-активным транспортным белком всегда идет от высокой внеклеточной концентрации в клетку, где концентрация натрия более низкая. Таким образом, во вторично-активном транспорте, движение Na^+ - всегда идет по градиенту концентрации, в то время как движение активно транспортируемого вещества на том же самом транспортном белке всегда осуществляется против градиента концентрации, то есть перемещения проходят от более низкой до более высокой концентрации. Движение активно транспортируемого вещества при вторичноактивном транспорте может быть или в клетку (в том же самом направлении как Na^+), тогда этот процесс называется ко-транспортом или из клетки (против направления движения натрия), тогда это называется противотранспортом.

На рис. 1-30, расположенном на двух страницах, показано 18 наиболее распространенных обменников, транспортеров, ко-транспортеров, расположенных в мембране различных клеток.

Рис.	1-30.	Некоторые	известные	типы
обменников (<i>exchanger</i>), транспортеров (<i>transporter</i>) и			ко-транспортеров	(<i>co-transporter</i>),
расположенных в мембране различных клеток				





Аббревиатуры аминокислот

Аминокислота	Трехбуквенное сокращение	Краткое сокращение	Свойства цепи
Alanine	Ala	A	Nonpolar
Arginine	Arg	R	Basic (+1)
Asparagine	Asn	N	Polar
Aspartic acid	Asp	D	Acidic (-1)
Cysteine	Cys	C	Polar (-SH)
Glutamine	Gln	Q	Polar
Glutamic acid	Glu	E	Acidic (-1)
Glycine	Gly	G	None
Histidine	His	H	Basic (+1)
Isoleucine	Ile	I	Nonpolar
Leucine	Leu	L	Nonpolar
Lysine	Lys	K	Basic (+1)
Methionine	Met	M	Nonpolar
Phenylalanine	Phe	F	Nonpolar
Proline	Pro	P	Nonpolar
Serine	Ser	S	Polar (-OH)
Threonine	Thr	T	Polar (-OH)
Tryptophan	Trp	W	Nonpolar
Tyrosine	Tyr	Y	Aromatic (-OH)
Valine	Val	V	Nonpolar

Рис. 1-31. Аббревиатуры различных аминокислот и свойства их концевых цепей
Индексы физических величин

Значение	10 ⁹	10 ⁶	10 ³	10 ⁻³	10 ⁻⁶	10 ⁻⁹	10 ⁻¹²	10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹⁸
Название	гига	мега	кило	милли	микро	нано	пико	фемто	атто
Индекс	G	M	k	m	μ	n	p	f	a

Физические константы

Число Авогадро	N	$= 6.0221 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
Элементарный заряд	q_e	$= 1.6022 \times 10^{-19} \text{ C}$
Число Фарадея	F	$= Nq_e = 9.6485 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}$
Абсолютная температура	$T(\text{K})$	$= 273.15 + T(^{\circ}\text{Celsius})$
Постоянная Больцмана	k_B	$= 1.3807 \times 10^{-23} \text{ V C K}^{-1}$ $= 1.3807 \times 10^{-23} \text{ J K}^{-1}$
Газовая постоянная	R	$= 1.987 \text{ cal mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ $= 8.3145 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ $= 8.3145 \text{ V C mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$
Постоянная Планка	h	$= 6.6261 \times 10^{-34} \text{ J s}$
Один Джоуль	1 J	$= 1 \text{ kg m}^2 \text{ s}^{-2}$ $= 1 \text{ V C} = 1 \text{ W s}$ $= 0.2389 \text{ cal}$

Величины KT/F (or kbT/q_e)

Temperature (°C)	RT/F (mV)	2.303 RT/F (mV)
0	23.54	54.20
5	23.97	55.19
10	24.40	56.18
15	24.83	57.17
20	25.26	58.17
25	25.69	59.16
30	26.12	60.15
35	26.55	61.14
37	26.73	61.54

Рис. 1-32. Физические единицы и константы

Электрохимический потенциал

Электрохимический потенциал $\Delta\mu$ равен:

$$\Delta\mu = \mu_0 + RT \ln(C_2/C_1) + zF(\phi_2 - \phi_1)$$

μ_0 зависит только от природы растворителя и не зависит от концентрации иона и электрического потенциала;

$RT \ln(C_2/C_1)$ равно работе по концентрированию раствора от C_1 до C_2 ;

$zF(\phi_2 - \phi_1)$ равно работе по преодолению сил электрического отталкивания, возникающих при разности потенциалов $(\phi_2 - \phi_1)$ между растворами.

Условие равновесия иона находящегося с двух сторон относительно мембраны:

$$\mu_{0 \text{ out}} + RT \ln a_{\text{out}} + zF\phi_{\text{out}} = \mu_{0 \text{ in}} + RT \ln a_{\text{in}} + zF\phi_{\text{in}}$$

Равновесный потенциал

При наличии мембраны

$$\Delta\mu = \mu_0 + RT \ln(C_{\text{in}}/C_{\text{out}}) + zF(\phi_{\text{in}} - \phi_{\text{out}})$$

Ион в концентрации $[C]$ находится в равновесии когда $\Delta\mu = 0$

Тогда:

$$0 = \mu_0 + RT \ln(C_{\text{in}}/C_{\text{out}}) + zF E_m$$

Или:

$$E_m = -RT/zF \ln(C_{\text{in}}/C_{\text{out}}) \text{ или } E_m = RT/zF \ln(C_{\text{out}}/C_{\text{in}})$$

Рис. 1-33. Электрохимический и равновесный потенциал

Расчет равновесного потенциала для ионов

Концентрации ионов в цитоплазме гигантского аксона кальмара, в крови кальмара

Ион	Концентрация, mM		Радиус иона в кристалле, нм	Гидратационное число
	Цитоплазма	Кровь		
K^+	400	20	0.133	2.9
Na^+	50	440	0.095	4.5
Cl^-	40 – 150	560	0.181	2.9
Ca^{2+}	0.4	10	0.099	7.0
Mg^{2+}	10	54	0.066	10.0

Расчет равновесного потенциала для основных ионов у гигантского аксона кальмара

$$E_{Na} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[Na^+]_{out}}{[Na^+]_{in}} = 2.3 \frac{RT}{F} \cdot \lg \frac{[Na^+]_{out}}{[Na^+]_{in}} = 58 \cdot \lg \frac{[Na^+]_{out}}{[Na^+]_{in}} = 58 \cdot \lg \frac{440}{50} = +55mV$$

$$E_K = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} = 2.3 \frac{RT}{F} \cdot \lg \frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} = 58 \cdot \lg \frac{[K^+]_{out}}{[K^+]_{in}} = 58 \cdot \lg \frac{20}{400} = -75mV$$

$$E_{Ca} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[Ca^{2+}]_{out}}{[Ca^{2+}]_{in}} = 2.3 \frac{RT}{F} \cdot \lg \frac{[Ca^{2+}]_{out}}{[Ca^{2+}]_{in}} = 58 \cdot \lg \frac{[Ca^{2+}]_{out}}{[Ca^{2+}]_{in}} = 58 \cdot \lg \frac{10}{0.4} = +81mV$$

$$E_{Cl} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{[Cl^-]_{in}}{[Cl^-]_{out}} = 2.3 \frac{RT}{F} \cdot \lg \frac{[Cl^-]_{in}}{[Cl^-]_{out}} = 58 \cdot \lg \frac{[Cl^-]_{in}}{[Cl^-]_{out}} = 58 \cdot \lg \frac{40}{560} = -66mV$$

Рис. 1-34. Расчет равновесного потенциала для ионов у гигантского аксона кальмара
Уравнение Д. Гольдмана (D.E. Goldman):

$$V_m = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{P_K[K^+]_{out} + P_{Na}[Na^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_K[K^+]_{in} + P_{Na}[Na^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}}$$

Поток ионов через мембрану

$$\vec{j}_k = -D \cdot \text{grad } C,$$

где постоянная D — коэффициент диффузии, $\text{см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$.
 $D = RTu$

$$\vec{j}_k = -RTu \cdot \text{grad } C$$

$$\vec{j}_k = -RTu \cdot \frac{dC_k}{dx}$$

$$\vec{j}_k = -z_k \cdot F \cdot u_k \cdot C_k \frac{d\varphi}{dx}$$

$$\vec{J}_k = -RTu \cdot \frac{dC_k}{dx} - z_k \cdot F \cdot u_k \cdot C_k \frac{d\varphi}{dx}$$

Рис. 1-35. Поток ионов через мембрану и формула Гольдмана

Электрические свойства клетки

Искусственные мембраны представляют собой только липидный бислой и не содержат белков (рис. 1-36 А1). Показанную на данном рисунке мембрану можно представить в виде эквивалентной электрической схемы (рис. 1-36 А2), включающей емкостной компонент мембраны (C) и резистивный компонент (R). Это связано с тем, что, во-первых, липидный бислой напрямую можно уподобить электрическому элементу конденсатору, а во вторых, электрическому элементу резистору (сопротивлению).

Простейший конденсатор представляет собой две обкладки, находящиеся на небольшом расстоянии друг от друга. Когда его подсоединяют к источнику постоянного тока, то одна его обкладка заряжается положительно, а другая - отрицательно. Емкость такого конденсатора зависит от площади обкладок (чем меньше площадь, тем меньше емкость) и от расстояния между ними (чем меньше расстояние, тем больше емкость). Напряжение V на зажимах элемента емкости и ток I , проходящий через элемент, связаны между собой соотношением:

$$I = C \frac{dV}{dt} \quad (1.2)$$

Удельная емкость искусственных липидных мембран Мюллера и Мюллера-Рудина (C) равна около $0,4-1 \text{ } \mu\text{F}/\text{см}^2$. (Эта величина близка и для мембран клеток, поскольку и их емкость обусловлена исключительно липидным бислоем.)

Вместе с тем искусственный липидный бислой обладает крайне высоким сопротивлением (R), величина которого лежит в диапазоне 10^6 - $10^9 \Omega \text{см}^2$ (поскольку жир, по существу, служит изолятором), что на несколько порядков выше сопротивления биологической мембраны

(R_m), величина которой около $10^3 \Omega \text{см}^2$. Как было отмечено, столь высокое сопротивление липидного бислоя можно понизить добавлением белков (электрическое сопротивление которых значительно меньше электрического сопротивления липидов) или соединений, образующих ионные каналы.

В электротехнике напряжение V , приложенное к элементу активного сопротивления R , и ток I , проходящий через него, связаны между собой линейным соотношением, которое представляет собой запись закона Ома:

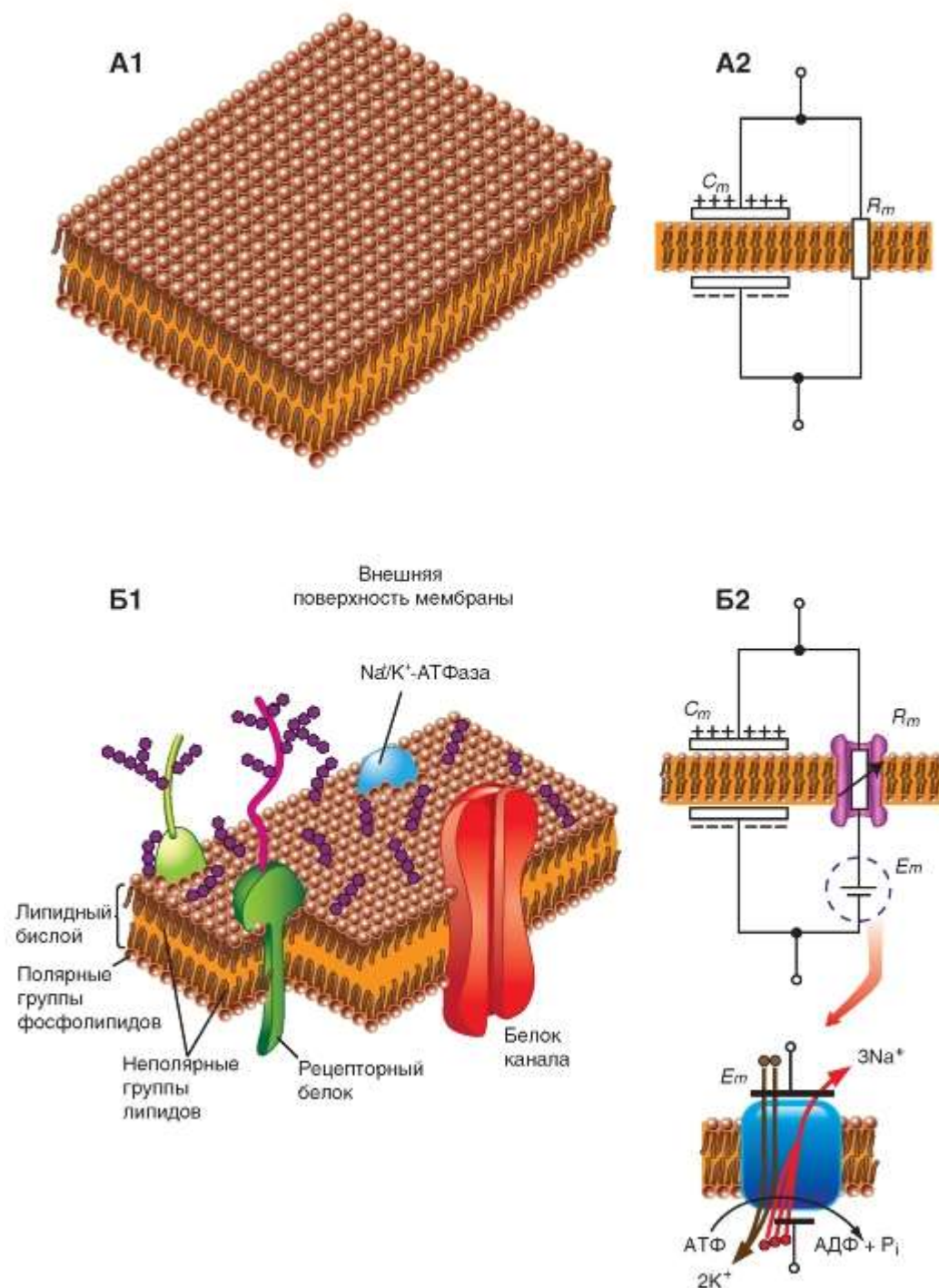
$$V = I \times R \quad (1.3)$$

Рассмотрим теперь реальную мембрану клетки, представленную на рис. 1-36 Б1. Такая мембрана содержит липидный бислой, в который встроены различные белковые молекулы, выполняющие разнообразные функции, о чем речь пойдет в следующих разделах. Это и различные рецепторные белки, и белки ионных каналов, через которые ионы движутся пассивно, и, наконец, белки, ответственные за активный перенос ионов (например, показанная на рисунке Na^+/K^+ -АТФаза).

Такую мембрану можно представить в виде эквивалентной электрической схемы (рис. 1-36 Б2), включающей емкостной компонент мембраны (C_m) и резистивный компонент (R_m). Емкостной компонент (C_m) реальной мембраны клетки обусловлен исключительно ее липидным бислоем, а резистивный компонент (R_m) белками, встроенными в липидный бислой, и, прежде всего, белками, образующими ионные каналы. Но в эту эквивалентную электрическую схему введена еще и батарея (E_m), формирующая разность потенциалов относительно мембраны. Ее роль выполняет специфический белок мембраны - Na^+/K^+ -АТФаза, создающая разность потенциалов относительно мембраны клетки.

Рис. 1-36. Пассивные электрические свойства клетки.

В части (А) представлены модель искусственной мембраны (А1) и ее эквивалентная электрическая схема (А2), состоящая из емкости (конденсатора) (C), роль которого играет липидный бислой, и сопротивления (R) этого липидного бислоя. В части (Б) представлены модель мембраны клетки (Б1) и ее эквивалентная электрическая схема (Б2), состоящая из конденсатора (C_m), роль которого играет липидный бислой, переменного сопротивления (R_m), при помощи которого моделируют ионные каналы, находящиеся в открытом или закрытом состоянии, и, наконец, батареи (E_m), создающей разность потенциалов между внешней и внутренней средой клетки. Обратите внимание, что на эквивалентной электрической схеме мембраны элемент «батарея» последовательно соединен с элементом «сопротивление», что соответствует требованиям классической электроники. Однако роль батареи выполняет все та же мембрана, а ее разность потенциалов создает находящийся в мембране белок (фермент) Na^+/K^+ -АТФаза, которая схематично представлена в круге



Сопротивление мембраны клетки

Для изучения мембран клеток применяются законы, используемые для описания элементов линейных цепей и их параллельного и последовательного соединений, рассмотренные выше. Обсудим их применительно к пассивным электрическим характеристикам клеток.

Одно из этих пассивных электрических свойств — отношение изменения мембранного потенциала (ΔV_m) к току I , текущему через мембрану (рис. 1-37 А).

Это отношение называется сопротивлением мембраны (R) и измеряется в Омах. Сопротивление характеризует способность мембраны препятствовать протеканию тока. Поскольку ток течет не только через нее, но и через внутреннюю и наружную среды, а геометрия клетки часто неизвестна, суммарное сопротивление, преодолеваемое током,

называется входным сопротивлением (R_{input} или, сокращенно, - R_{in}). Закон Ома, описывающий соотношение между током, напряжением и сопротивлением в электрических цепях, полностью применим и к биологическим мембранам:

$$R_{in} = \frac{\Delta V_m}{I} \quad (1.4)$$

Величина, обратная сопротивлению ($1/R_{in}$), характеризует способность мембраны проводить ток. Это соотношение называется проводимостью (G_{in}). Уменьшение сопротивления мембраны эквивалентно увеличению проводимости.

$$G_{in} = \frac{I}{\Delta V_m} \quad (1.5)$$

Рассмотрим идеализированное тело нейрона без аксонов и дендритов (рис. 1-39 Б).

Если с помощью внутриклеточного электрода пропускать ток силой 0,1 нА ($1 \text{ нА} = 10^{-9} \text{ А}$) наружу, то он равномерно протекает через всю поверхность клеточной мембраны (за счет эквипотенциальности поверхности шара идеализированной клетки). В результате деполяризационный сдвиг потенциала на 10 мВ, зарегистрированный в соседней точке внутри клетки, указывает на то, что в этой точке клетка (мембрана и аксоплазма) имеет сопротивление 100 МОм ($1 \text{ МОм} = 10^6 \text{ Ом}$):

$$R_{in} = \frac{\Delta V_m}{I} = \frac{10 \times 10^{-3}}{1 \times 10^{-10}} = 100 \times 10^6 \text{ Ом} \quad (1.6)$$

Такая величина типична, например, для нервных клеток моллюсков. В зависимости от геометрии клетки и свойств мембраны входные сопротивления нейронов могут варьировать в пределах от 10^5 до 10^8 Ом ; чем меньше клетка, тем выше ее входное сопротивление (при одинаковых свойствах мембраны). Сопротивление мембраны можно изобразить соединенным последовательно с батареей, создающей мембранный потенциал E_m .

Поскольку при измерении R_{in} размеры и форма нейрона не учитываются, этот параметр не подходит для сравнения свойств мембраны у клеток различной величины и формы. Вместо этого применяют стандартизированный параметр - удельное сопротивление мембраны (R_m), соответствующее поперечному сопротивлению 1 см^2 мембраны.

Таким образом, удельное сопротивление мембраны определяется двумя факторами:

- сопротивлением мембраны, являющимся мерой проводящих свойств мембраны, т.е. ее проницаемости для ионов;
- общей площадью поверхности мембраны.

Для клетки, имеющей входное сопротивление 100 МОм и радиус 100 мкм (площадь поверхности $1,26 \times 10^{-3}$ или приблизительно 10^{-3} см²), получим:

$$R_m = 108 \Omega \times 10^{-3} \text{ см}^2 = 105 \Omega \times \text{см}^2 = 100\,000 \Omega \times \text{см}^2 \quad (1.7)$$

Эта величина также типична для тел нервных клеток моллюсков. У большинства других животных мембраны клеточных тел нейронов более проницаемы для ионов и обладают значительно меньшими величинами мембранного сопротивления - примерно от 20 Ом·см² (перехваты Ранвье периферических аксонов лягушки) до 16 000 Ом·см² (тела маутнеровских клеток миноги).

Однако в экспериментальной работе площадь поверхности клетки измерить крайне сложно, поэтому в исследованиях для нормирования используют емкость мембраны, так как она пропорциональна площади поверхности клетки.

Для сферической клетки без дендритов с радиусом r и поверхностью $4\pi r^2$ величина R_m определяется по формуле:

$$R_m = R_{in} \times 4\pi r^2 \quad (1.8)$$

Кроме сопротивления мембраны R_m (Ом·см²), или иначе удельного сопротивления мембраны, используют следующие параметры:

Сопротивление мембраны на единицу длины волокна r_m (Ом·см), равное $R_m/\pi d$, где d - диаметр волокна.

Сопротивление цитоплазмы (r_{in}) на единицу длины для тока, текущего вдоль аксона, равное $R_{in}/\pi r^2$. Для клетки с R_{in} , равным 50 Ом·см, и радиусом аксона 50 мкм, r_{in} равно $6,3 \times 10^5$ Ом/см.

Кроме того, используют внеклеточное сопротивление r_{out} (Ом/см) на единицу длины для тока, текущего вдоль аксона.

Емкость мембраны

Стимулируя клетку небольшими импульсами электрического тока, можно изучить еще одно свойство мембраны. Если даже импульсы тока (I_m), вызывающие изменение мембранного потенциала (DV_m), нарастают и спадают очень быстро (это прямоугольные импульсы), мембранный потенциал все равно будет нарастать и спадать медленно (рис. 1-37 В). Это обусловлено еще одним физическим свойством мембраны - ее емкостью. Емкость накапливает заряды на своей поверхности, и поэтому будет оказывать сопротивление любым изменениям потенциала. Ток может течь в емкость или из нее только тогда, когда напряжение на ней меняется. Как только емкость зарядится до потенциала, равного подаваемому на нее, емкостной ток прекратится. Таким образом, емкость не препятствует изменениям потенциала, а замедляет его увеличение и уменьшение.

Мембрана работает как емкость, потому что внутриклеточная и внеклеточная среды представляют собой электролиты, которые являются хорошими проводниками, тогда как имеющая высокое сопротивление мембрана служит хорошим изолятором. Благодаря своим емкостным свойствам клетки могут накапливать (или разделять) заряды. Например, если импульс постоянного электрического тока вызовет изменение мембранного потенциала, то на внутренней и наружной поверхностях мембраны возникнет заряд, пропорциональный DV_m . Входная емкость мембраны (C_{in}) будет определяться как

отношение заряда q (Кл), возникшего на каждой стороне мембраны, к изменению мембранного потенциала:

$$C_{in} = \frac{q}{\Delta V_m} \quad (1.9)$$

Емкость клетки прямо пропорциональна площади поверхности мембраны (большая площадь внешнего и внутреннего жидких проводников позволяет мембране удерживать большой заряд) и обратно пропорциональна ее толщине (увеличение толщины мембраны уменьшает взаимодействие зарядов, находящихся на каждой из проводящих поверхностей). Поскольку толщина всех клеточных мембран примерно одинакова (7,5 нм), емкость мембраны (C_m) зависит, главным образом, от площади поверхности и рассчитывается на 1 см² поверхности мембраны. Мембранный потенциал клетки равен заряду мембраны, деленному на ее емкость ($V_m = q/C_m$). Емкость измеряется в фарадах: 1 Ф = 1 Кл (6,24×10¹⁸ электронов) на 1 В.

Если бы мы пропустили прямоугольный импульс электрического тока только через сопротивление мембраны, он вызвал бы прямоугольный скачок напряжения. Но поскольку мембрана работает так же как и емкость, а та удерживает заряды, проходящему через мембрану току требуется некоторое время, чтобы изменить потенциал на мембране. Поскольку емкость и сопротивление мембраны соединены параллельно, напряжение на них будет одно и то же, так что в каждый данный момент емкость мембраны будет нести заряд, пропорциональный мембранному потенциалу. Для того чтобы импульс электрического тока смог полностью изменить мембранный потенциал до нового значения (определяемого силой тока и сопротивлением мембраны), ток сначала должен изменить заряд на емкости мембраны и сдвинуть его до уровня, соответствующего новому мембранному потенциалу. Таким образом, ток, подаваемый в клетку, сначала должен войти в емкость и выйти из нее, изменив ее заряд. По мере того как мембранный потенциал постепенно приближается к своему новому значению, все меньшая доля тока проходит через емкость и все большая доля начинает проходить через сопротивление. Когда емкость зарядится до конца, весь ток будет течь через сопротивление.

Таким образом, когда на мембрану подается импульс электрического тока, он идет по двум путям. Сначала ток протекает по емкости мембраны, изменяя заряд на ней. Этот компонент тока называется емкостным током (I_C). По мере заряда емкости снижаются емкостная составляющая тока и основная часть оставшегося тока, та, которая шла через сопротивление. Этот второй компонент называется током сопротивления (I_R), или ионным током (в клетках, где электричество переносится только ионами). Эти токи схематически представлены на рис. 1-37 А, В.

Итак, если мы подаем на мембрану ток, то протекание его через R_m описывается законом Ома:

$$I_R = \frac{\Delta V_m}{R_m}, \quad (1.10)$$

где ΔV_m - изменение мембранного потенциала, производимое током I_R .

Протекание тока через емкость можно рассчитать следующим образом. Емкостной ток равен скорости изменения заряда, т.е. $I_C = dq/dt$. Поскольку $q = C_m V_m$, величина емкостного тока определяется величиной емкости C_m и скоростью изменения напряжения (dV_m/dt):

$$I_C = C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (1.11)$$

Таким образом, общий ток через мембрану будет равен:

$$I_m = \frac{\Delta V_m}{R_m} + C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (1.12)$$

Временной ход I_R можно оценить по записи мембранного потенциала, так как $\Delta V_m = I_R R_m$. Поскольку $I_R + I_C = I_m$, ток через емкость (I_C) можно получить, вычитая из I_m величину I_R .

Рис. 1-37. Сопротивление и емкость мембраны.

$$\lambda = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{d R_m}{r_{in}}}, \quad (1.17)$$

где R_m - удельное сопротивление мембраны; r_{in} - удельное сопротивление аксоплазмы; d - диаметр аксона. Мы приводим лишь конечную формулу, поскольку в основе ее вывода лежат те же принципы, что и для постоянной времени.

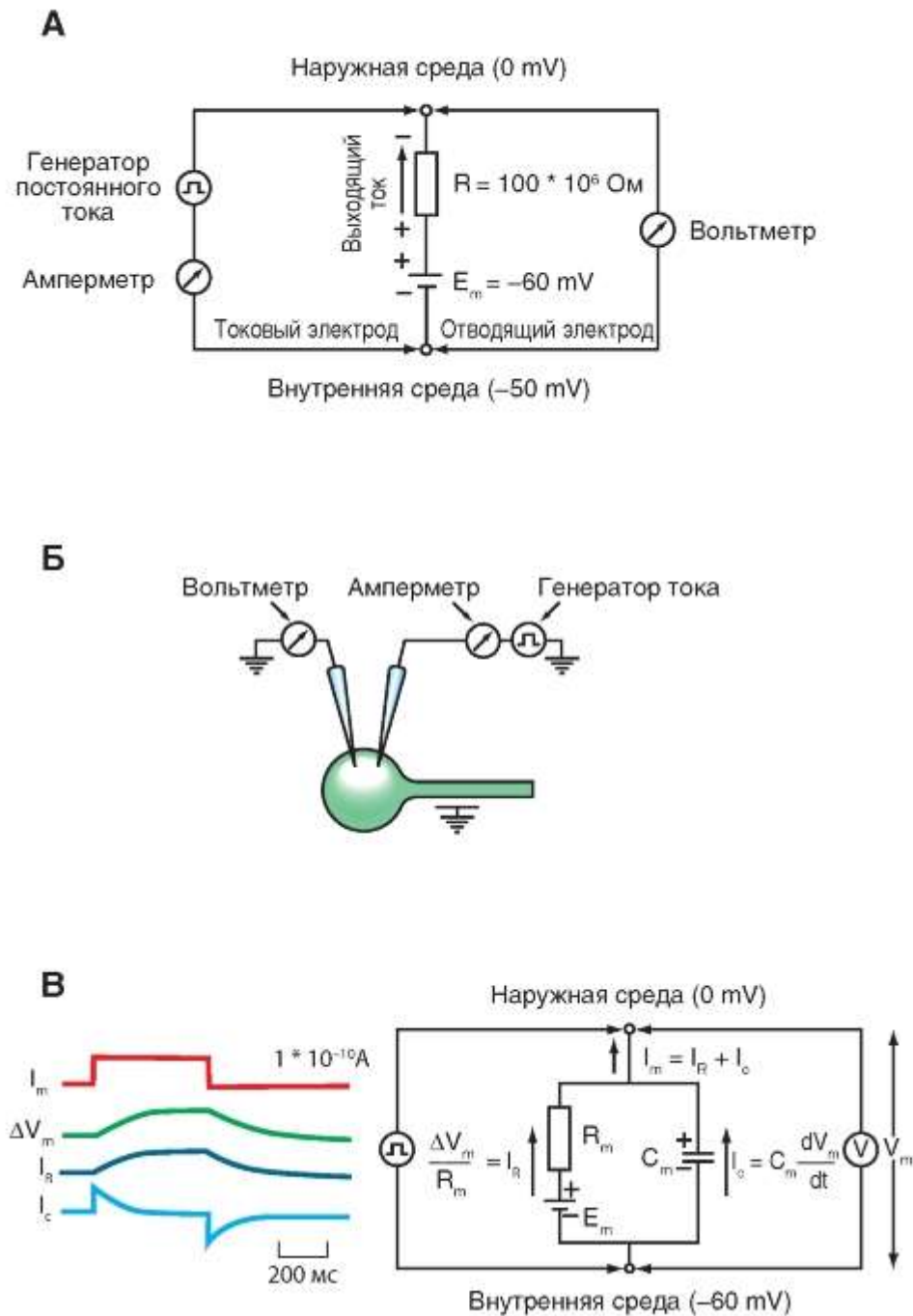
Постоянная длины мембраны - это расстояние, на которое вдоль аксона электротонически распространяются подпороговые сигналы. Если нейрон имеет сопротивление $R_m = 100\ 000\ \text{Ом}\cdot\text{см}^2$ и $r_{in} = 50\ \text{Ом}\cdot\text{см}^2$, постоянная длины при диаметре аксона 20 мкм равна 1 см. Но для аксонов малого диаметра d постоянная длины может быть значительно меньше и достигать 0,1 см.

Рис. 1-38. Определение постоянных времени и длины.

А - постоянная времени. На панели А1 изображена схема эксперимента. Через стимулирующий внутриклеточный микроэлектрод на клетку подается импульс электрического тока, а изменения мембранного потенциала измеряют с помощью регистрирующего внутриклеточного микроэлектрода. На панели А2 показано изменение мембранного потенциала во времени (нижняя кривая) на фоне подачи длительного импульса постоянного электрического тока (верхняя кривая). Ток вызывает деполяризацию величиной 10 мВ и сдвигает мембранный потенциал с -60 до -50 мВ. Время, необходимое для достижения 63,2% этого изменения, называют постоянной времени клеточной мембраны. В данном примере она равна 100 мс. На панели А3 показано изменение мембранного потенциала во времени (нижняя кривая) на фоне подачи короткого импульса постоянного электрического тока (верхняя кривая). Б - постоянная длины. На панели Б1 изображен принцип эксперимента. Через стимулирующий внутриклеточный микроэлектрод, введенный в аксон, подается импульс электрического тока, который распространяется электротонически по аксону, а изменения мембранного потенциала измеряются внутриклеточными регистрирующими микроэлектродами в точке стимуляции (V_1) и в различных точках вдоль аксона (V_2, V_3, V_4, V_5). На панели Б2 показаны изменения мембранного потенциала в зависимости от расстояния (сверху) и график уменьшения амплитуд. На панели Б3 изображена схема эксперимента. Через стимулирующий внутриклеточный микроэлектрод, введенный в тело нейрона, подается импульс электрического тока, который распространяется электротонически по аксону, а изменения мембранного потенциала измеряются внутриклеточными регистрирующими микроэлектродами у основания аксона (V_1) и в различных точках вдоль него (V_2, V_3, V_4, V_5). Внизу показаны изменения мембранного потенциала в зависимости от расстояния. В теле клетки ток вызывает деполяризацию величиной 10 мВ и сдвигает мембранный потенциал с -60 до -50 мВ (V_1). На расстоянии 1 см (V_2) это изменение потенциала уменьшается на 63%, достигая 37% своего исходного значения (3,7 мВ). Это расстояние (1 см) называют постоянной длины мембраны аксона

А - эквивалентная электрическая схема для участка мембраны, включающая только батарею (E_m), формирующую мембранный потенциал и последовательно соединенное с ней электрическое сопротивление (r_m). От генератора через мембрану пропускается постоянный электрический ток. Его величина регистрируется амперметром. Мембранный потенциал регистрируется тем или иным измерительным прибором (для простоты на схеме показан вольтметр). Зная величину подаваемого тока и величину зарегистрированного потенциала по закону Ома, можно рассчитать входное сопротивление мембраны клетки. Б - идеализированное тело клетки с эквипотенциальной поверхностью (например, нейрона без аксона и дендритов) при исследовании внутриклеточных потенциалов. Согласно классической схеме в клетку введен один микроэлектрод, регистрирующий ее потенциал, и второй микроэлектрод, соединенный с генератором прямоугольных импульсов электрического тока, используемый для смещения потенциала клетки в сторону деполяризации или гиперполяризации. В - эквивалентная электрическая схема для участка мембраны. (1) Если приложен прямоугольный импульс электрического тока I_m (красная кривая), создающий небольшой (пассивный электротонический) потенциал Δv_m , то этот ток разлагается на резистивную (синяя кривая) и емкостную (голубая кривая) составляющие.

Разностью i_m и i_r является i_c . (2) Цепь содержит батарею e_m , создающую потенциал покоя, соединенную последовательно с сопротивлением r_m и параллельно с емкостью C_m . Эквивалентная электрическая схема моделирует небольшой участок мембраны. На схеме показано, как часть тока проходит через сопротивление (i_r) и называется ионным током; другая часть течет к емкости и от емкости и называется емкостным током (I_C)



Постоянная времени мембраны

Постоянная времени мембраны (τ_m) - это время, необходимое для того, чтобы импульс постоянного тока зарядил емкость мембраны (сферической клетки) на 63% или, точнее, довел ее заряд до $1 - 1/e$ от его конечного значения, обусловленного величиной импульса электрического тока.

В фазе подъема (рис. 1-38 А2, А3) изменение потенциала V_m во времени при подаче импульса электрического тока описывается уравнением:

$$V_m = IR_m(1 - e^{-t/R_m C_m}), \quad (1.13),$$

где I - величина ступеньки тока, пропускаемого через мембрану; IR_m - конечное значение мембранного потенциала, обусловленного импульсом электрического тока. При $t = \tau = R_m C_m$ имеем:

$$V_m = IR_m(1 - e^{-1}) = IR_m(1 - 1/e) = 0,63IR_m \quad (1.14).$$

Постоянную времени мембраны ($\tau = R_m C_m$) можно измерить непосредственно по записям напряжения (см. рис. 1-38 А2, А3). В приведенном примере для нейрона моллюска с $R_m = 100\,000\, \Omega \times \text{см}^2$ типичное значение τ будет равно 100 мс. Для различных клеток значения τ варьируются от одной до нескольких сотен миллисекунд. У сферической клетки без аксона и дендритов постоянную времени можно представить как:

$$\tau_m = R_m C_m \quad (1.15).$$

Таким образом, измерение τ важно также для оценки C_m . Пусть τ равно 100 мс, а $R_m = 100\,000\, \Omega \times \text{см}^2$, тогда емкость C_m будет равна $1\, \text{мФ}/\text{см}^2$:

$$C_m = \frac{100 \times 10^{-3} \text{с}}{1 \times 10^5 \, \Omega \times \text{см}^2} = 100 \times 10^{-8} \, \text{Ф}/\text{см}^2 = 1 \, \text{мФ}/\text{см}^2 \quad (1.16)$$

Постоянная длины мембраны

Постоянная длины мембраны (λ) - это расстояние от точки в нейроне, где при помощи внутриклеточного электрода был изменен мембранный потенциал, до той точки на аксоне, где этот потенциал потеряет 63% или иначе $1 = 1/e$ своей первоначальной величины.

Изменения потенциала в различных точках аксона можно измерить с помощью введения регистрирующих электродов (V_1, V_2, V_3, V_4) на различных расстояниях вдоль аксона (рис. 1-38 Б1). Пусть аксон имеет большой диаметр, сравнимый с размером клеточного тела. Тогда постоянная длины (в сантиметрах) будет определяться формулой:

$$\lambda = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{dR_m}{r_{in}}}, \quad (1.17)$$

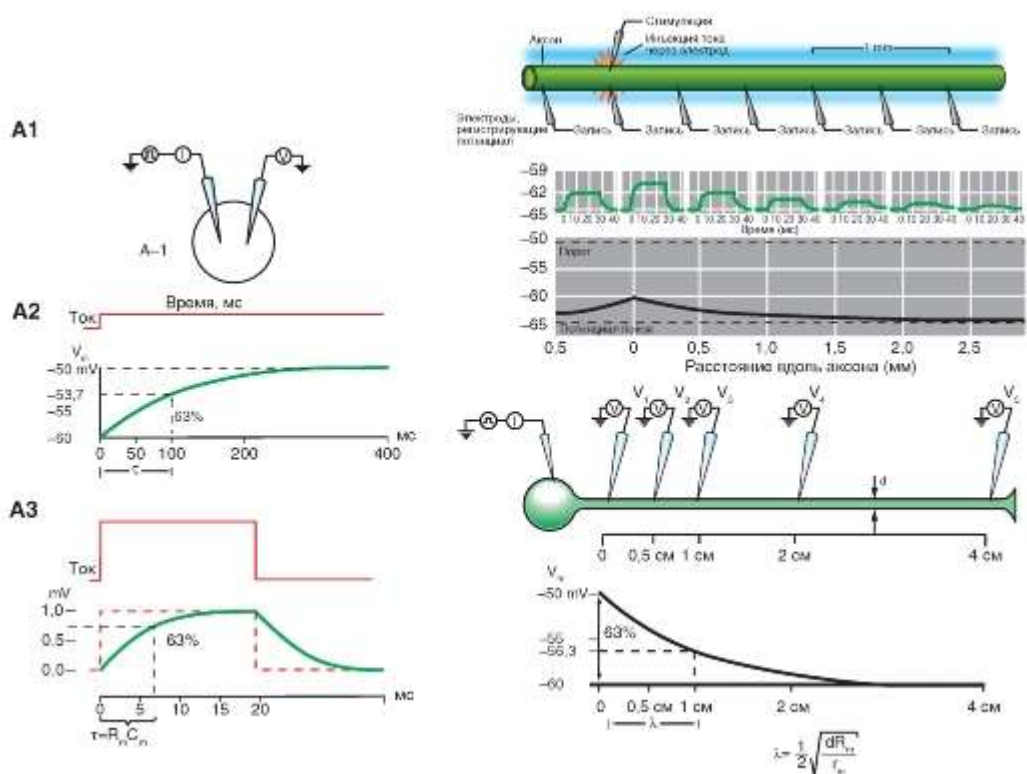
где R_m - удельное сопротивление мембраны; r_{in} - удельное сопротивление аксоплазмы; d - диаметр аксона. Мы приводим лишь конечную формулу, поскольку в основе ее вывода лежат те же принципы, что и для постоянной времени.

Постоянная длины мембраны - это расстояние, на которое вдоль аксона электротонически распространяются подпороговые сигналы. Если нейрон имеет

сопротивление $R_m = 100\ 000\ \text{Ом}\cdot\text{см}^2$ и $r_{in} = 50\ \text{Ом}\cdot\text{см}^2$, постоянная длины при диаметре аксона 20 мкм равна 1 см. Но для аксонов малого диаметра d постоянная длины может быть значительно меньше и достигать 0,1 см.

Рис. 1-38. Определение постоянных времени и длины.

А - постоянная времени. На панели А1 изображена схема эксперимента. Через стимулирующий внутриклеточный микроэлектрод на клетку подается импульс электрического тока, а изменения мембранного потенциала измеряют с помощью регистрирующего внутриклеточного микроэлектрода. На панели А2 показано изменение мембранного потенциала во времени (нижняя кривая) на фоне подачи длительного импульса постоянного электрического тока (верхняя кривая). Ток вызывает деполяризацию величиной 10 мВ и сдвигает мембранный потенциал с -60 до -50 мВ. Время, необходимое для достижения 63,2% этого изменения, называют постоянной времени клеточной мембраны. В данном примере она равна 100 мс. На панели А3 показано изменение мембранного потенциала во времени (нижняя кривая) на фоне подачи короткого импульса постоянного электрического тока (верхняя кривая). Б - постоянная длины. На панели Б1 изображен принцип эксперимента. Через стимулирующий внутриклеточный микроэлектрод, введенный в аксон, подается импульс электрического тока, который распространяется электротонически по аксону, а изменения мембранного потенциала измеряются внутриклеточными регистрирующими микроэлектродами в точке стимуляции (V_1) и в различных точках вдоль аксона (V_2, V_3, V_4, V_5). На панели Б2 показаны изменения мембранного потенциала в зависимости от расстояния (сверху) и график уменьшения амплитуд. На панели Б3 изображена схема эксперимента. Через стимулирующий внутриклеточный микроэлектрод, введенный в тело нейрона, подается импульс электрического тока, который распространяется электротонически по аксону, а изменения мембранного потенциала измеряются внутриклеточными регистрирующими микроэлектродами у основания аксона (V_1) и в различных точках вдоль него (V_2, V_3, V_4, V_5). Внизу показаны изменения мембранного потенциала в зависимости от расстояния. В теле клетки ток вызывает деполяризацию величиной 10 мВ и сдвигает мембранный потенциал с -60 до -50 мВ (V_1). На расстоянии 1 см (V_2) это изменение потенциала уменьшается на 63%, достигая 37% своего исходного значения (3,7 мВ). Это расстояние (1 см) называют постоянной длины мембраны аксона



Потенциал покоя и его механизмы

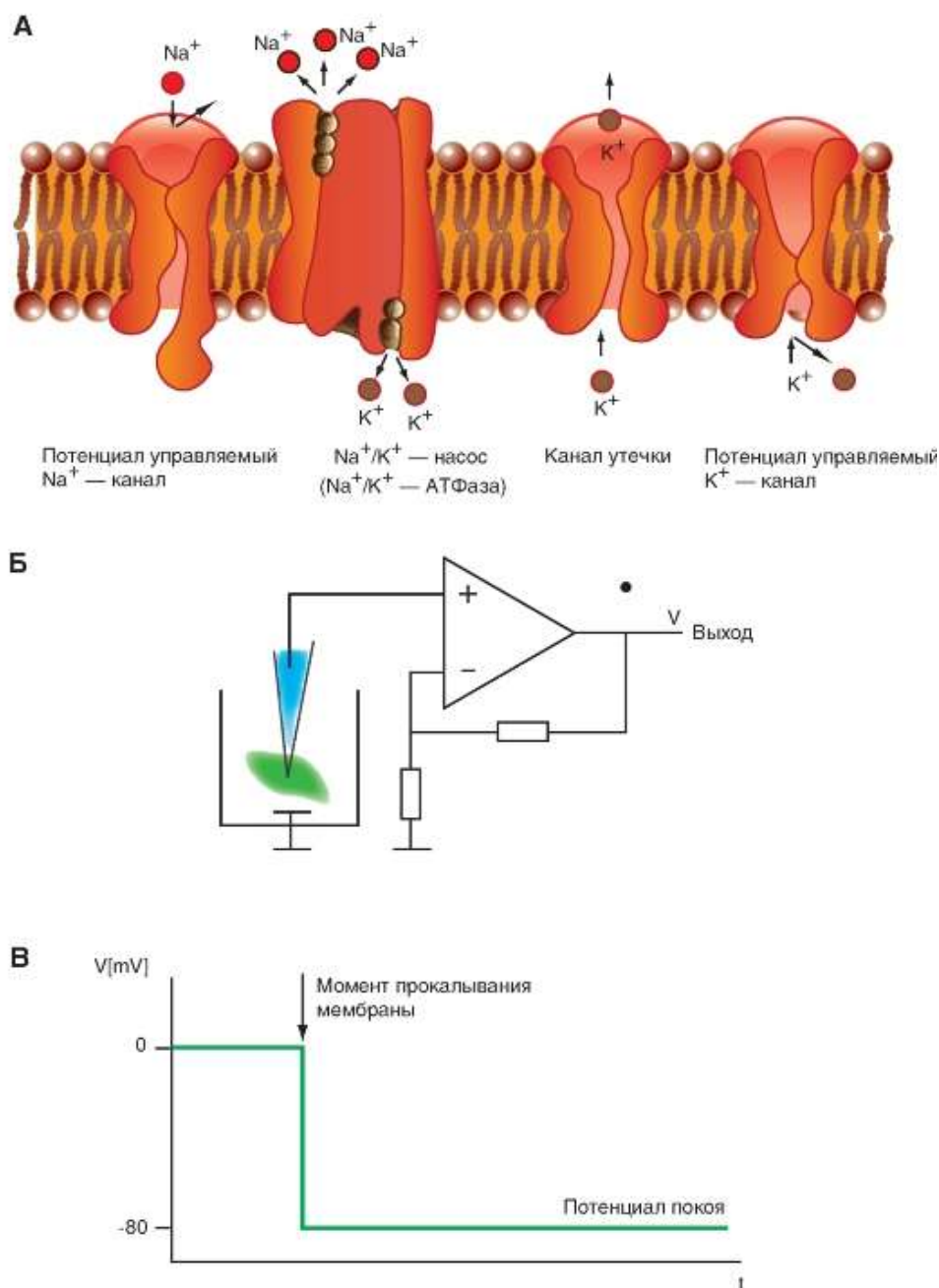
Потенциал покоя клетки определяется работой Na^+/K^+ -АТФазы и выходом ионов K^+ по каналам утечки при очень незначительном входе ионов Na^+ через них (рис. 1-39 А). Распределение ионов относительно мембраны, а именно внутри клетки, поддерживается механизмом активного транспорта Na^+ и K^+ , или электрогенным Na^+/K^+ -насосом, который удерживает внутри клетки концентрацию Na^+ на низком, а концентрацию K^+ на высоком уровнях, транспортируя Na^+ из клетки наружу, а K^+ из наружной среды внутрь. Поскольку равновесный потенциал для ионов Na^+ равен $+55$ мВ, а потенциал мембраны клетки лежит в диапазоне от -60 до -80 мВ, существует движущая сила для ионов Na^+ , и они устремляются по каналам утечки вовнутрь клетки, что могло бы деполяризовать ее мембрану. Однако каналы утечки проницаемы и для ионов K^+ , для которых сохраняется электрохимический градиент, направленный из внутриклеточной области к внеклеточной среде. Так как равновесный потенциал ионов K^+ равен примерно -90 мВ, через мембрану одновременно проходят и ионы K^+ тем самым, противодействуя деполяризации, обусловленной входящим током ионов Na^+ . При этом работа Na^+/K^+ -АТФазы удерживает внутри клетки концентрацию Na^+ на низком, а концентрацию K^+ на высоком уровнях. Имеющуюся в клетке трансмембранную разность потенциалов можно зарегистрировать.

Если микроэлектрод, подключенный к предварительному усилителю, показанному на рис. 1-39 Б, подключить к измерительной схеме и ввести в физиологический раствор, где расположены ткань или клетки, при этом замкнуть цепь через индифферентный электрод, то при сбалансированном усилителе и компенсации физико-химических свойств микроэлектрода на экране осциллографа мы будем регистрировать линию (рис. 1-39 В), соответствующую измерительному нулю, равному нулю при закороченных входах усилителя. Теперь если подвести при помощи микроманипулятора микроэлектрод вплотную к мембране клетки и проколоть ее, то на экране осциллографа можно зарегистрировать падение нулевого потенциала и разность потенциалов между внутренней и наружной средами клетки, величина которой для разных клеток лежит в

диапазоне от -40 до -80 мВ. Именно эта разность, представленная на рис. 1-39 В, служит потенциалом покоя клетки.

Рис. 1-39. Потенциал покоя клетки и принцип его регистрации.

А - структуры мембраны, формирующие потенциал покоя. На панели А представлена мембрана клетки, канал утечки, Na^+ -канал, K^+ -канал и -АТФаза, которая выкачивает ионы Na^+ из клетки против его электрохимического градиента, одновременно вводя ионы K^+ в клетку также против его электрохимического градиента. Каналы утечки, через которые осуществляется очень незначительный вход ионов Na^+ в клетку и превышающий его в 100 раз выход ионов K^+ из клетки. За счет каналов утечки и работы Na^+/K^+ -АТФазы возникает негативный внутриклеточный потенциал мембраны клетки - потенциала покоя. Б - измерительная схема. В - потенциал покоя



Потенциалы клетки, возникающие при деполяризации ее мембраны, и принцип искусственного смещения потенциала

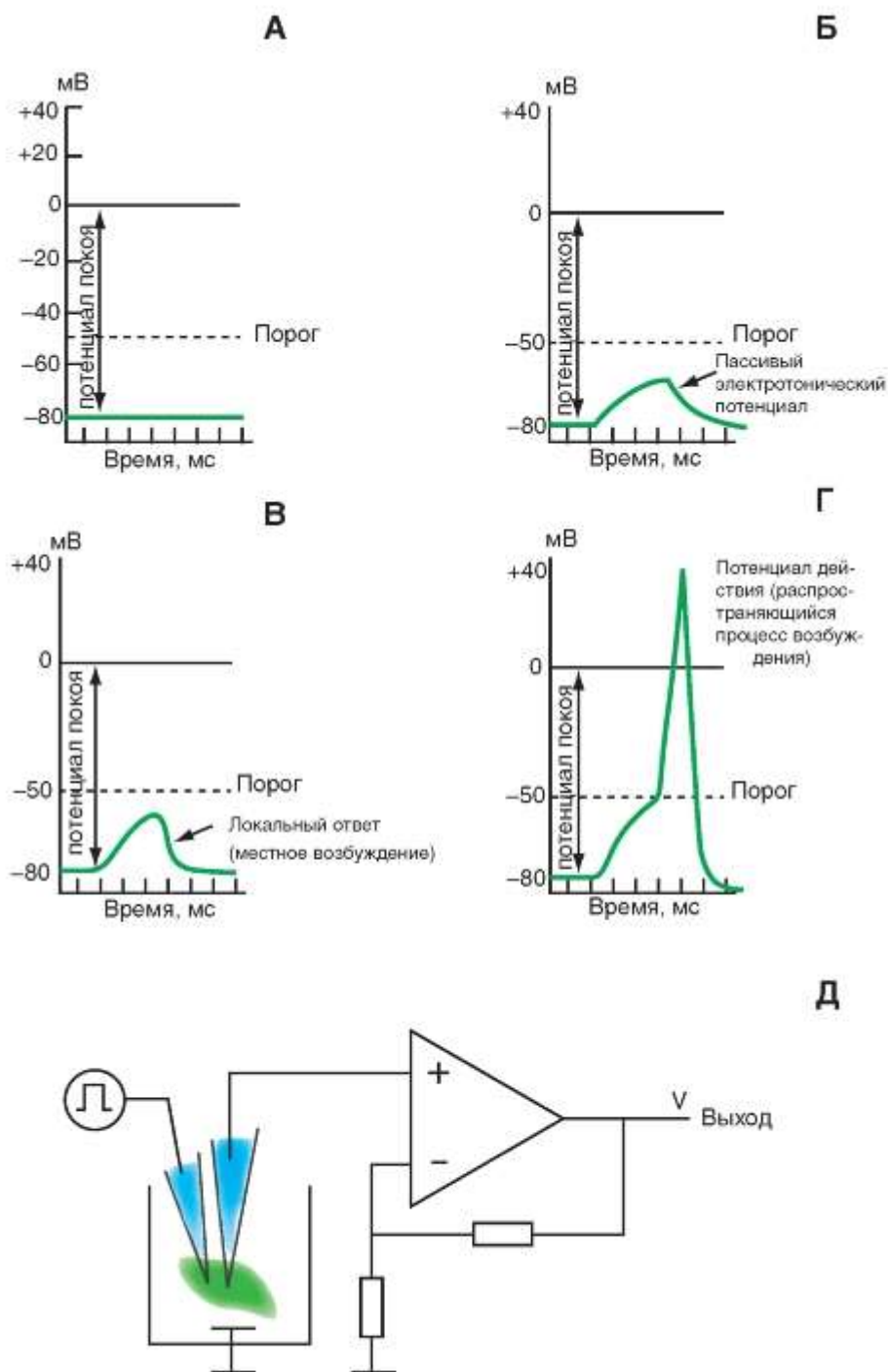
Помимо потенциала покоя (рис. 1-40 А), пассивный транспорт ионов через ионные каналы мембраны определяет возникновение еще трех потенциалов, представленных на рисунке. К ним принадлежат пассивный электротонический потенциал (рис. 1-40 Б), локальный ответ (рис. 1-40 В) и потенциал действия (рис. 1-40 Г). Однако для их возникновения требуется поляризация мембраны клетки. Эта поляризация может осуществляться как внеклеточно, что обычно используют на нервных волокнах, так и внутриклеточно, что применяют на клетках. Пассивный электротонический потенциал зарождается при заведомо подпороговом смещении потенциала покоя. Локальный ответ возникает при подпороговом, но близком к порогу смещении потенциала покоя. Наконец, потенциал действия зарождается, когда смещение потенциала покоя доведено до пороговой величины.

Однако, чтобы зарегистрировать эти потенциалы, необходимо искусственное смещение потенциала покоя клетки. Возможность внутриклеточной поляризации мембраны, включающей деполяризацию и гиперполяризацию, крайне необходима для изучения свойств мембраны. Искусственное смещение мембранного потенциала дает возможность не только изучать пассивные электрические характеристики клеток, но и исследовать межклеточные взаимодействия, осуществляемые непосредственно через высокопроницаемые контакты мембран клеток. Однако возможность внутриклеточной поляризации мембран должна непременно сочетаться с возможностью одновременной регистрации биоэлектрической активности клеток и тех изменений этой активности, которые возникают вследствие приложения электрического тока.

В наиболее примитивном виде принцип внутриклеточной поляризации мембран при возможности одновременной регистрации биоэлектрической активности клеток представлен на рис. 1-40 Д. В этом случае в клетку одновременно вводят два микроэлектрода, один из которых поляризующий, а другой - регистрирующий. На экране двухлучевого осциллографа можно видеть весь процесс: на первом канале регистрируется величина поляризующего сигнала, а на втором канале - мембранный потенциал и его искусственное смещение, вызванное поляризацией мембраны. Следует помнить, что прямое подключение поляризующего микроэлектрода к генератору невозможно, для этого существуют специальные схемы.

Рис. 1-40. Изменение мембранного потенциала в зависимости от силы раздражения.

А - потенциал покоя. Б - пассивный электротонический потенциал. В - локальный ответ. Г - потенциал действия. Д - выход



Пассивный электротонический потенциал

Пассивный электротонический потенциал можно зарегистрировать с помощью одного внутриклеточного микроэлектрода, если через второй микроэлектрод внутриклеточно поляризовать клетку прямоугольным импульсом электрического тока, не достигающим критического потенциала (подпороговым) (рис. 1-41 А).

Пассивный электротонический потенциал возникает в ответ на подпороговый импульс электрического тока, который не приводит к открытию потенциалуправляемых ионных каналов и определяется только емкостными и резистивными свойствами мембраны клетки. Емкостной компонент мембраны обусловлен исключительно липидным

бислоем, а резистивный компонент - белками, образующими ионные каналы и встроенными в липидный бислой.

Липидный бислой можно уподобить конденсатору, две обкладки которого находятся на небольшом расстоянии друг от друга, и при подаче тока одна обкладка заряжается положительно, а другая - отрицательно. Ионные каналы липидного бислоя или в этом случае мембраны клетки обладают проводимостью, и, следовательно, мембрана характеризуется электрическим сопротивлением.

На рисунке 1-41 Б изображена эквивалентная электрическая схема мембраны клетки, а на рис. 1-41 В показана эквивалентная электрическая схема фрагмента мембраны. На подаваемый ток и изменения сопротивления и напряжения эта схема реагирует точно так же, как и сама мембрана.

Данная схема включает емкостной компонент мембраны (C_m) и резистивный компонент (R_m), а также учитывает сопротивления внешней среды r_{out} и сопротивление цитозоля r_{in} . Поскольку значения r_{out} и r_{in} малы, ими можно пренебречь, хотя это достаточно грубая аппроксимация. Кроме того, r_{out} много меньше r_{in} .

Если на мембрану через один микроэлектрод подать подпороговый прямоугольный импульс электрического тока положительной полярности (рис. 1-41 Г - импульс красного цвета), то усилитель, подключенный ко второму микроэлектроду, зарегистрирует изменения мембранного потенциала, форма которого отличается от прямоугольника (зеленая кривая). Это и есть пассивный электротонический потенциал.

Если мы подаем на мембрану ток, то его протекание через R_m описывается законом Ома:

$$I_R = \frac{V_m}{R_m}, \quad (1.18)$$

где V_m - потенциал на R_m .

Протекание тока через емкость можно рассчитать следующим образом:

$$I_C = C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (1.19)$$

Таким образом, для общего тока, текущего в покое через мембрану, получаем:

$$I_m = \frac{V_m}{R_m} + C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (1.20)$$

Емкостной компонент мембраны C_m обусловлен исключительно липидным бислоем, а резистивный компонент R_m - белками, образующими ионные каналы и встроенными в липидный бислой. Интегрируя выражение, получим:

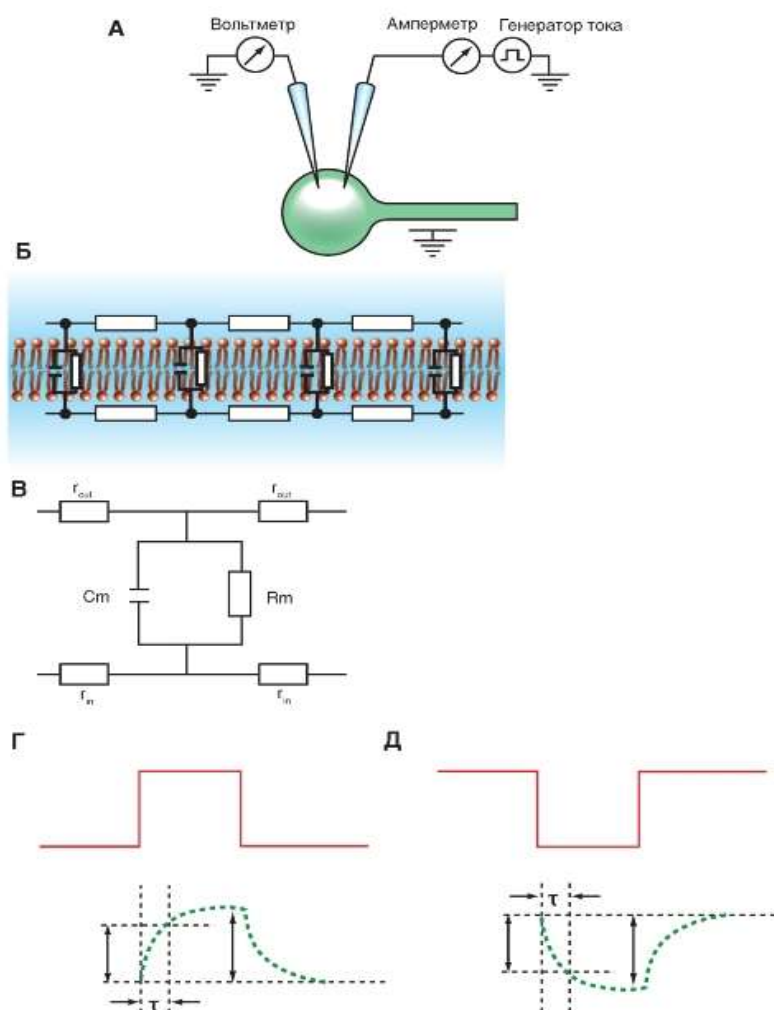
$$V(t) = V_0 + R_m I_m (1 - e^{-\frac{t}{C_m R_m}}), \quad (1.21)$$

где $R_m C_m = \tau_m$, что называется постоянной времени (временем релаксации мембраны). Постоянная времени мембраны τ - одна из важнейших характеристик пассивного электротонического потенциала, которая отражает пассивные свойства мембраны. Последнее уравнение крайне важно, поскольку величины τ_m и R_m можно, в отличие от C_m , зарегистрировать экспериментально и, следовательно, таким образом рассчитать C_m . С помощью постоянной времени и R_m можно полностью описать пассивные свойства эквивалентной схемы (или мембраны).

Постоянная времени характеризует временной ход изменений мембранного потенциала, т.е. скорость, с которой он меняется при переходе от одного значения к другому. Постоянная времени мембраны - это время, необходимое для того, чтобы импульс постоянного тока зарядил емкость мембраны на 63% (см. рис. 1-41 Г).

Сходная картина возникает, если на мембрану через один микроэлектрод подать аналогичный по силе прямоугольный импульс электрического тока отрицательной полярности (рис. 1-41 Д - импульс красного цвета). В этом случае пассивный электротонический потенциал будет направлен в отрицательную область (зеленая кривая).

Рис. 1-41. Пассивный электротонический потенциал



Механизм пассивного электротонического потенциала

Пассивный электротонический потенциал определяется только емкостными и резистивными свойствами мембраны клетки, но мы относим его к потенциалам клетки, связанным с пассивным ионным транспортом, т.е. транспортом через ионные каналы. Это обусловлено тем, что электрическая цепь, включающая положительный вход усилителя, микроэлектрод, клетку, индифферентный электрод и отрицательный вход усилителя, может быть замкнута только в том случае, если мембрана имеет возможность проводить через себя электрический ток, носителем которого в системе клетки и внеклеточного раствора служат ионы. Эту возможность дают постоянно открытые каналы утечки. Однако пассивный электротонический потенциал не приводит к открытию потенциалуправляемых ионных каналов. В том случае емкостные и резистивные свойства мембраны клетки достаточно постоянны. Емкость в основном определяется липидным бислоем, а сопротивление клетки зависит от сопротивления, которое определяется открытыми каналами утечки.

На рисунке 1-42 А показан пассивный электротонический потенциал, в котором мы искусственно выделяем отдельные фазы (0 - потенциал покоя, 1 - фаза нарастания, 2 - фаза падения), а также клетка в каждую из этих фаз. Из рисунка следует, что на фоне потенциала покоя, т.е. в фазу 0, открыты только каналы утечки, через которые ионы K^+ выходят из клетки, а ионы Na^+ в незначительном количестве входят в клетку. Это соотношение обычно принято как $K^+: Na^+=100:1$. При этом потенциалуправляемые Na^+ -каналы, обеспечивающие входящий ток, и потенциалуправляемые K^+ -каналы, обеспечивающие выходящий ток, закрыты (находятся в состоянии покоя). В фазу 1 и фазу 2 также открыты только каналы утечки, через которые ионы K^+ выходят из клетки, а ионы Na^+ в незначительном количестве входят в клетку. Соотношение $K^+: Na^+=100:1$ не меняется. При этом потенциалуправляемые Na^+ -каналы, обеспечивающие входящий ток, и потенциалуправляемые K^+ -каналы, обеспечивающие выходящий ток, также закрыты (находятся в состоянии покоя). При нарастании потенциала (фаза 1), как и при его падении (фаза 2) до уровня потенциала покоя, не происходит никаких изменений ионных токов, поскольку, как отмечалось, пассивный электротонический потенциал определяется только емкостными и резистивными свойствами мембраны.

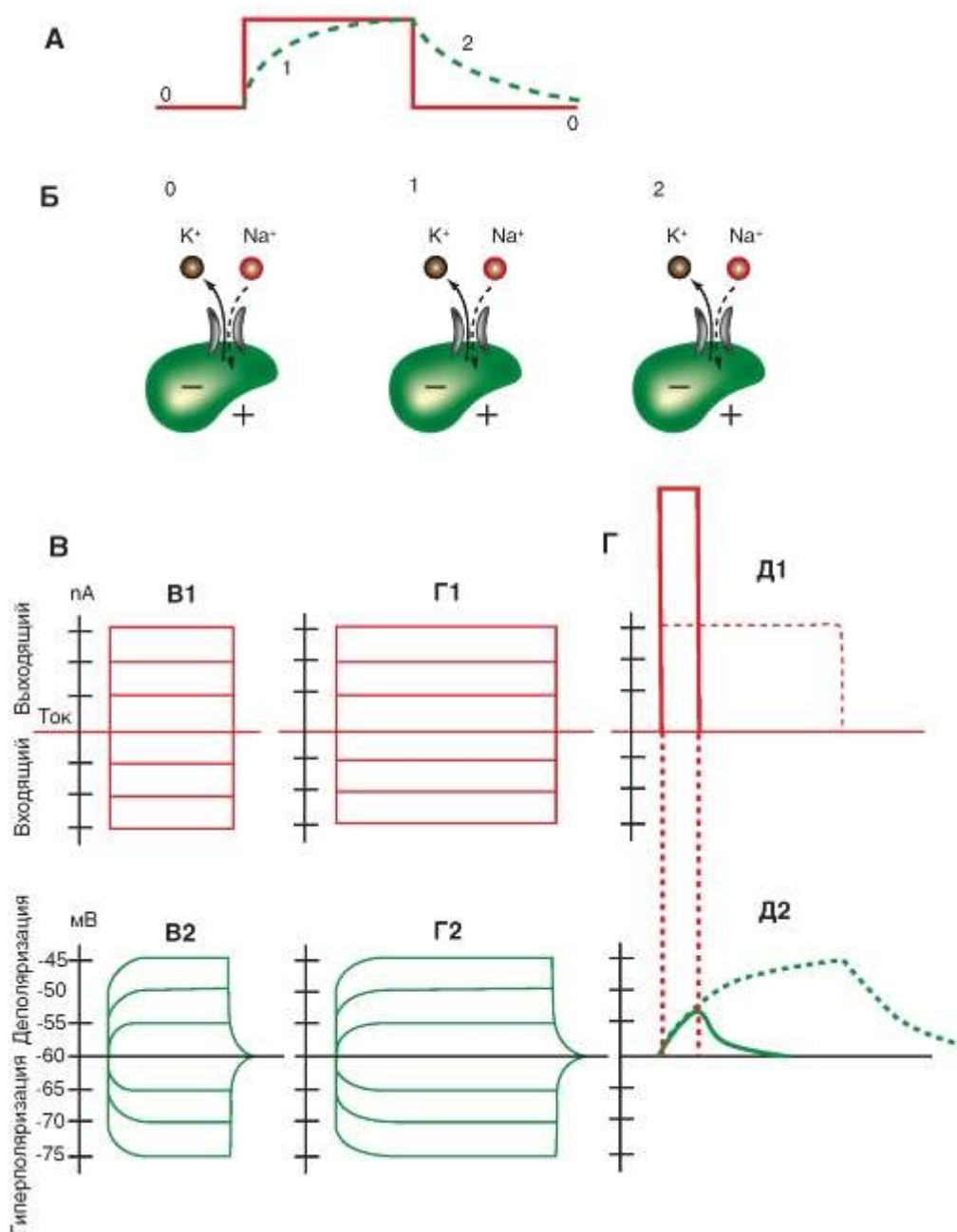
Характерная особенность пассивного электротонического потенциала состоит в равенстве скоростей нарастания и спада экспоненты. Для различных клеток значения τ_m варьируют от одной до нескольких сотен миллисекунд, однако для одной и той же клетки эта величина равна вне зависимости от длительности и направления поляризующего импульса электрического тока. Это еще одна особенность пассивного электротонического потенциала.

Наконец, если дискретно увеличивать амплитуду поляризующего импульса электрического тока, оставаясь тем не менее в подпороговом диапазоне его силы (рис. 1-42 В1), то амплитуда каждого пассивного электротонического потенциала будет равна амплитуде импульса тока, его вызывающего. В этом проявляется строго линейная зависимость между амплитудами электрического стимула и пассивного электротонического потенциала (рис. 1-42 В2). Значительное увеличение длительности поляризующего импульса не меняет этой закономерности (рис. 1-42 Г1, Г2). Ранее мы обсуждали, что как только емкость зарядится до потенциала, равного подаваемому на нее, емкостной ток прекратится. Таким образом, она не препятствует изменениям потенциала, а только замедляет его нарастание и падение.

На клетку можно подать прямоугольный импульс электрического тока сверхпороговой амплитуды, т.е. величиной в несколько вольт или даже в несколько десятков вольт, без ущерба для данной клетки, если длительность этого импульса будет меньше значения τ_m для данной клетки. В этом случае емкость мембраны не успевает полностью зарядиться и, следовательно, клетка не набирает столь большой потенциал (рис. 1-42 Д1, Д2).

Наконец, последняя особенность пассивного электротонического потенциала заключается в том, что в волокне, например аксоне, он распространяется с затуханием, характеризующим постоянную длины мембраны λ , т.е. расстояние вдоль аксона, на котором напряжение, приложенное в одной точке нейрона, теряет 63% ($1-1/e$) своей первоначальной величины.

Рис. 1-42. Влияние различных прямоугольных импульсов электрического тока на форму пассивного электротонического потенциала



Метод фиксации тока

Были предложены три способа использования микроэлектродов, дошедшие до настоящих дней в той или иной технической модификации. Во-первых, внутриклеточная регистрация при помощи микроэлектрода биоэлектрических параметров мембран клеток. Во-вторых, поляризация через микроэлектрод мембран клеток электрическим током. В-

третьих, подача через микроэлектрод ионов или биологически активных соединений, причем метод подачи веществ на поверхность мембраны клетки назван аппликацией, а метод введения веществ внутрь клетки - ионофорезом.

Стеклянная микропипетка становится микроэлектродом после заполнения ее сквозного продольного канала электролитом и образования контакта электролита с электронно-измерительной схемой. Контакт электролита и микроэлектрода может быть двух типов и зависит от того, какой биологический объект изучается. Первый тип - так называемая жесткая фиксация микроэлектрода - применяется для внутриклеточных исследований неподвижных тканей или клеток, например клеток нервной системы.

Второй тип - так называемый плавающий микроэлектрод - применяется для внутриклеточных исследований сокращающейся ткани, например, миокарда.

Для регистрации внутриклеточного потенциала мембраны применяют крайне простую измерительную аппаратуру, представляющую собой усилитель на основе микросхемы, имеющей высокое входное сопротивление, на несколько порядков превышающее сопротивление мембраны клетки, включенный в режиме повторителя, и микроэлектрод (рис. 1-43 А, Б). В этом случае мы будем иметь дело со следующей эквивалентной измерительной схемой (рис. 1-43 В), а регистрируемый внутриклеточный сигнал будет иметь вид, показанный на рис. 1-43 Г.

Если же нам надо внутриклеточно поляризовать клетку, то в наиболее примитивном виде принцип внутриклеточной поляризации мембран при возможности одновременной регистраций биоэлектрической активности клеток представлен на рис. 1-43 Д. В этом случае в клетку вводят одновременно два микроэлектрода, один из которых поляризующий, а другой - регистрирующий. На экране двухлучевого осциллографа можно будет видеть процесс (рис. 1-43 З), когда на верхнем первом канале регистрируется величина поляризующего сигнала, а на нижнем втором канале - мембранный потенциал и его искусственное смещение, вызванное поляризацией мембраны. Следует помнить, что прямое подключение поляризующего микроэлектрода к генератору, как это условно показано на рисунке, невозможно. Для этого существуют специальные схемы.

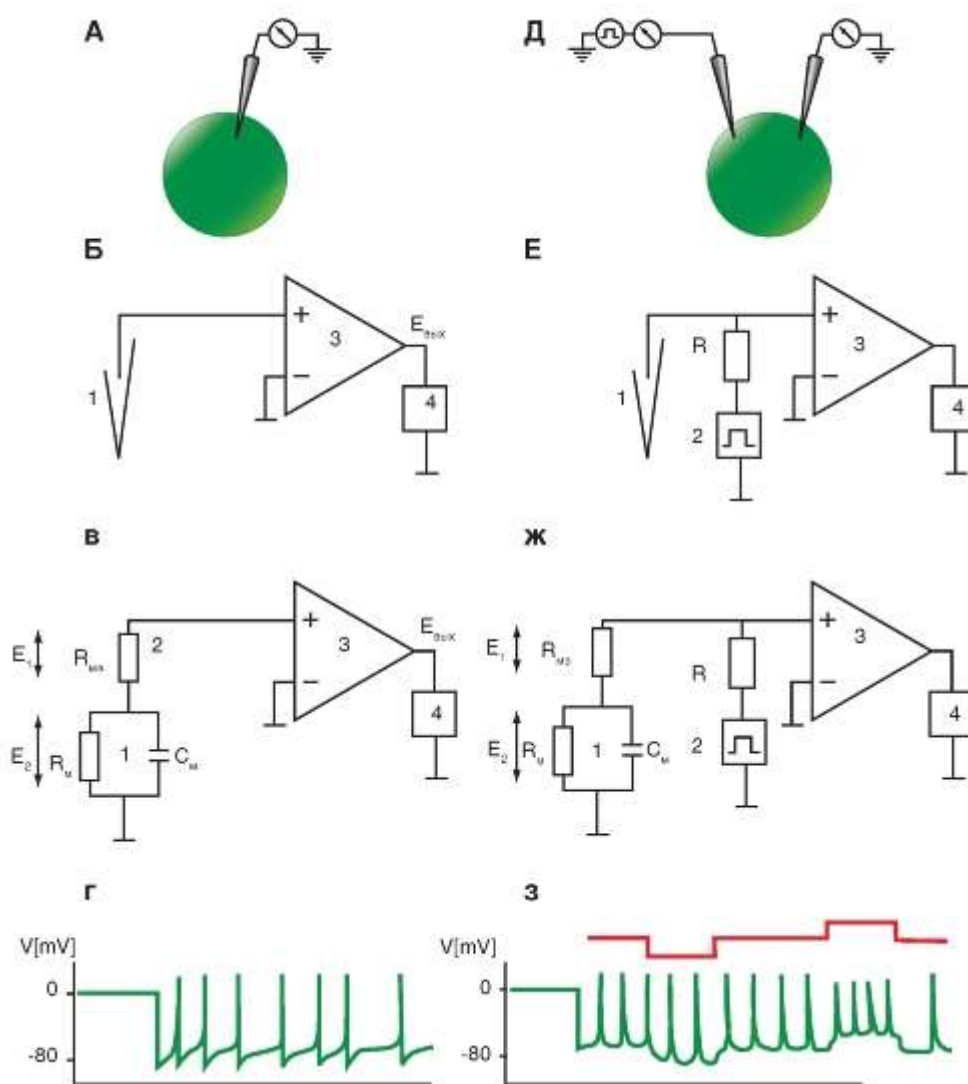
Вместе с тем даже при технически грамотном подходе использование двух микроэлектродов для введения в одну клетку - задача весьма сложная, даже если работа выполняется на гигантских нейронах беспозвоночных. Если же необходимо изучать межклеточное, например электротоническое, взаимодействие двух нейронов, то в препарат необходимо ввести четыре микроэлектрода (по два в каждую клетку), что практически невыполнимо. В то же время при изучении мелких клеток ввести два микроэлектрода в одну клетку просто невозможно. В этом случае необходимо, чтобы один микроэлектрод выполнял роль и регистрирующего, и поляризующего. Для этой цели была разработана схема, получившая название схемы фиксации тока в цепи измерений или *current clamp* схемы.

Метод *current clamp* представляет наибольший интерес, поэтому мы остановимся на нем подробно. Такая схема представлена на рис. 1-43 Е. Сопротивление R должно быть достаточно высоко и в 20-50 раз превышать входное сопротивление клетки. Сопротивление R должно быть также достаточно высоким, чтобы при подаче импульса стимуляции ток не зависел от сопротивления микроэлектрода. Для этого оно должно в 20-50 раз превышать сопротивление микроэлектрода. Обычно требуемая величина R лежит в диапазоне от 10^9 до 10^{10} Ом. Эти резисторы достаточно редки. Кроме того, они требуют специального обращения, так как любое повреждение центрального цветного кольца, пыль или отпечатки пальцев на поверхности и прочее существенно уменьшают их величину. Что же достигается этим принципом? Поскольку сопротивление R значительно превышает входное сопротивление клетки и сопротивления микроэлектрода, ток в цепи измерений будет определяться максимальным сопротивлением - сопротивлением R - и не

будет зависеть от изменений сопротивлений клетки и микроэлектрода, т.е. ток в цепи измерений будет равен *const*, и мы можем, внутриклеточно поляризуя клетку, измерять ее мембранный потенциал.

В этом случае мы будем иметь дело со следующей эквивалентной измерительной схемой (рис. 1-43 Ж), а регистрируемый внутриклеточный сигнал будет иметь вид, показанный на рис. 1-43 З.

Рис. 1-43. Принципы регистрации внутриклеточных потенциалов и внутриклеточной поляризации



Локальный ответ

При увеличении силы раздражителя в виде электрического тока появляются признаки так называемого локального ответа мембраны, которые заключаются в изменении формы пассивного электротонического потенциала и появлении самостоятельно развивающегося пика относительно небольшой амплитуды, по форме напоминающего S-образную кривую. Это и есть локальный ответ (рис. 1-44 А). По мере усиления раздражающего тока амплитуда локального ответа увеличивается нелинейно и может не только достигать критического потенциала, но и превышать его, не перерастая, однако, в потенциал

действия. Самостоятельное развитие локального ответа определяется уже не только каналами утечки, но и открытием потенциалуправляемых Na^+ - и K^+ -каналов. Таким образом, в своем развитии локальный ответ проходит две фазы: фазу пассивного электротонического потенциала; собственно фазу локального ответа (см. рис. 1-44 А).

Если дискретно увеличивать амплитуду поляризующего импульса электрического тока, оставаясь, однако, в подпороговом диапазоне, то амплитуда каждого пассивного электротонического потенциала будет пропорциональна амплитуде импульса тока, его вызывающего. В этом проявляется строго линейная зависимость между амплитудами электрического стимула и пассивного электротонического потенциала (рис. 1-44 Б, кривые 1 и 2). Однако при более сильной деполяризации появляются первые признаки локального ответа, заключающиеся в изменении формы пассивного электротонического потенциала и появлении самостоятельно развивающегося пика относительно небольшой амплитуды, по форме напоминающего S-образную кривую. Первые признаки локального ответа возникают при действии стимулов, составляющих приблизительно 75% пороговой величины (рис. 1-44 Б, кривые 3-5). По мере дальнейшего усиления раздражающего тока амплитуда локального ответа увеличивается и может не только достигать критического потенциала, но и превышать его.

Таким образом, как было отмечено, можно условно говорить, что сам локальный ответ включает две фазы: фазу пассивного электротонического потенциала, при которой не происходит изменений потенциалуправляемых ионных токов через мембрану, и стадию собственно локального ответа. В последнем случае в механизме деполяризации мембраны существенную роль играют также изменения ионного транспорта, которые и приводят к самостоятельному изменению потенциала, проявляющегося в форме локального ответа. Сам локальный ответ обусловлен повышением Na^+ -проницаемости мембраны через потенциалуправляемые Na^+ -каналы, обеспечивающие входящий ток, вызывающий фазу деполяризации. Однако при подпороговом стимуле такое повышение проницаемости недостаточно велико для того, чтобы вызвать процесс регенеративной деполяризации мембраны, поскольку открывается лишь небольшая часть потенциалуправляемых Na^+ -каналов. Именно поэтому начавшаяся деполяризация не развивается в потенциал действия, а уравнивается увеличением K^+ -проводимости вследствие открытия опять-таки небольшого, но достаточного количества потенциалуправляемых K^+ -каналов. Далее за счет превалирующего выхода из клетки ионов K^+ потенциал возвращается на уровень потенциала покоя.

Поскольку локальный ответ обусловлен открытием потенциалуправляемых Na^+ - и K^+ -каналов, то можно сказать, что он сходен с потенциалом действия. Однако эти две формы ответа имеют существенные различия. В отличие от потенциала действия локальный ответ не имеет четкого порога возникновения; он не подчиняется закону «все или ничего» - с увеличением силы раздражителя амплитуда локального ответа растет. Любое, даже незначительное, изменение потенциала клетки изменяет количество открытых Na^+ - и K^+ -каналов. Появление же характерного S-образного ответа означает только, что величина локального ответа превышает величину пассивного электротонического потенциала. При этом не следует забывать, что кинетика открывания быстрых потенциалуправляемых Na^+ -каналов и медленных K^+ -каналов различна. Именно поэтому при достижении определенного уровня деполяризации (порог генерации потенциала действия) и соответственно количества открытых Na^+ -каналов, ток через K^+ -каналы не «успевает» уравновесить Na^+ -ток, что приводит к дальнейшей деполяризации и открыванию большего количества Na^+ -каналов, т.е. возникает потенциал действия.

В естественных условиях организма локальный ответ представляет собой электрофизиологическое выражение местного возбуждения.

Рис. 1-44. Локальный ответ нервного волокна.

А - форма пассивного электротонического потенциала и локального ответа. Б - пассивный электротонический потенциал, перерастающий в локальный ответ и далее в потенциал действия, при увеличении силы раздражителя. Кривые 1 и 2 представляют собой пассивный электротонический потенциал, вызываемый увеличивающимися по амплитуде деполяризующими импульсами электрического тока. На кривых 3, 4 и 5 к пассивному электротоническому потенциалу присоединяется деполяризация в форме локального ответа. При пороговой силе тока локальный ответ перерастает в потенциал действия б. Ступеньки деполяризующих импульсов электрического тока отмечены красным цветом. В - механизм возникновения локального ответа

Потенциал действия

Если электровозбудимую клетку или нервное волокно подвергнуть действию электрического раздражителя пороговой величины, то возникает возбуждение этого участка, электрофизиологическим выражением которого является потенциал действия. Это возбуждение распространяется по всей мембране и называется распространяющимся.

На рисунке 1-45 А продемонстрирован потенциал действия и его фазы. Он начинается в результате смещения потенциала покоя (например, от -90 мВ) прямоугольным импульсом электрического тока до уровня критического потенциала (разного для разных типов клеток). После чего в результате изменения ионных токов меняется и сам потенциал клетки, быстро нарастая в положительную область и доходя до 0 мВ. Обычно эту фазу называют фазой деполяризации. Потенциал действия продолжает возрастать, пересекая 0 мВ и достигая значений, лежащих около $+35$ мВ (точнее, разных значений для разных типов клеток). По достижении пика величина потенциала падает в отрицательную область, вновь достигая 0 мВ. Превышение потенциала действия над нулевой линией называется овершутом. Далее потенциал действия пересекает 0 мВ и достигает значений потенциала покоя. Эту фазу обычно называют фазой реполяризации.

В процессе реполяризации потенциал действия может возвращаться на уровень потенциала покоя по двум разным ионным механизмам (рис. 1-45 Б). Первый механизм приводит к тому, что от уровня критического потенциала реполяризация медленно и плавно переходит в потенциал покоя. Это следовая деполяризация (фиолетовая кривая). При втором механизме реполяризация достигает величины потенциала покоя и продолжается дальше в более отрицательную область, после чего возвращается к уровню потенциала покоя. Это следовая гиперполяризация (красная кривая).

Типы биоэлектрической активности нервных клеток

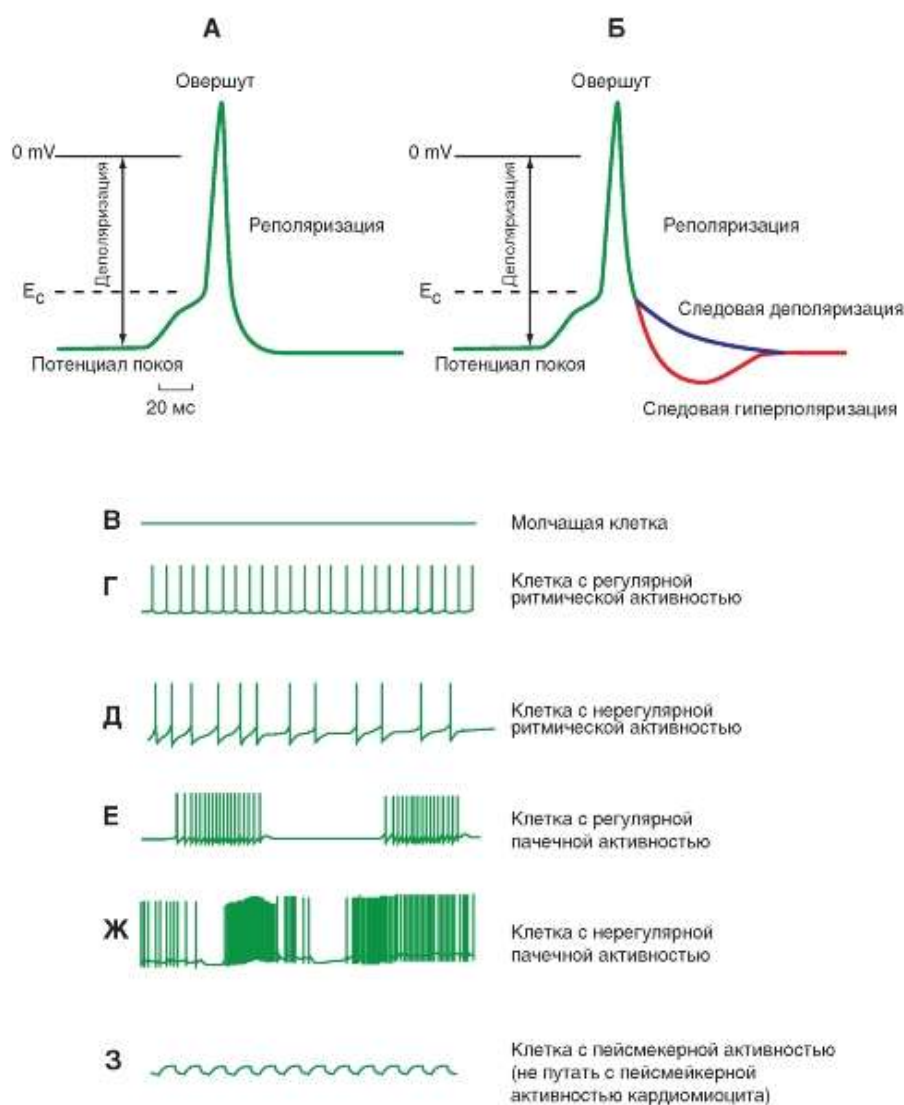
Рассмотрим типы биоэлектрической активности на примере нервных клеток (рис. 1-45), поскольку данные об этом для клеток других тканей изложены в соответствующих разделах. Часто потенциал действия возникает на фоне потенциала покоя под влиянием искусственной внутриклеточной деполяризации. Такой потенциал действия возникает у клеток с неменяющимся потенциалом покоя и, следовательно, такие клетки самостоятельно не генерируют потенциалы действия. Их называют «молчащими» (рис. 1-45 В). Это первый тип биоэлектрической активности нейронов.

Ко второму типу биоэлектрической активности клеток относятся нейроны, способные самостоятельно генерировать потенциалы действия. Механизмы этой генерации мы рассмотрим далее, а сейчас обратимся исключительно к феноменологической стороне вопроса. К этому типу относят клетки, генерирующие регулярную ритмическую активность (рис. 1-45 Г), нерегулярную ритмическую активность (рис. 1-45 Д), и регулярную пачечную (несколько потенциалов действия - «пачка», после чего наблюдается короткий период покоя) активность. При этом количество потенциалов действия в пачке и межпачечные интервалы одинаковые (рис. 1-45 Е). Наконец, это клетки, генерирующие нерегулярную пачечную активность. При этом количество

потенциалов действия в пачке, частота их возникновения и межпачечные интервалы разные (рис. 1-45 Д).

К третьему типу биоэлектрической активности клеток относятся нейроны, способные самостоятельно генерировать флуктуации потенциала покоя, не достигающие критического потенциала (рис. 1-45 Ж). Обычно эти флуктуации бывают синусоидальной или пилообразной формы. Только редкие осцилляции могут достигнуть порога и вызвать генерацию одиночных потенциалов действия. Этот тип потенциалов называется пейсмерным. К сожалению, как в отечественной, так и в зарубежной литературе этот термин несет две смысловые нагрузки. Во-первых, пейсмерными называют клетки, генерирующие истинный пейсмерный потенциал, показанный на рис. 1-45 З. Во-вторых, так называют клетки, способные к самостоятельной генерации потенциалов действия. В таком смысле этот термин особенно прижился в терминологии по электрофизиологии сердца, с чем читателю придется столкнуться далее.

Рис. 1-45. Потенциал действия и типы биоэлектрической активности на примере нервных клеток



Действие электрического тока

К числу основных раздражителей клеток принадлежит электрический ток.

Введем обозначения: E_m используется только для потенциала покоя клетки, V_m - для любых мембранных потенциалов, а ΔV_m означает любое изменение мембранного потенциала.

Если на мембрану клетки воздействовать импульсами электрического тока либо положительной, либо отрицательной полярности, то это воздействие вызовет смещение E_m соответственно либо в положительную область (деполяризация мембраны), либо в отрицательную область (гиперполяризация мембраны). На рисунке 1-46 А показано влияние прямоугольных импульсов электрического тока различной силы и полярности на E_m . Условие возникновения потенциала действия - критический потенциал E_c . Электрическое раздражение вызывает быстрое смещение мембранного потенциала до уровня E_c , при котором происходит активация потенциалуправляемых Na^+ -каналов, что и приводит к возбуждению мембраны в виде потенциала действия.

Величины E_m , E_c и ΔV_m можно связать следующим выражением:

$$\begin{aligned} E_m + \Delta V_m &= E_c \\ \text{или} \quad \Delta V_m &= E_c - E_m \end{aligned} \quad (1.22)$$

На рисунке 1-46 А1 показан прямоугольный импульс электрического тока положительной полярности, вызывающий смещение E_m до величины E_c , что приводит к возникновению потенциала действия. В этом случае величина порогового потенциала станет равна $\Delta V_{m,1}$.

Далее показан (рис. 1-46 А2) прямоугольный импульс электрического тока положительной полярности, причем первая ступень, смещая E_m в более положительную область, не вызывает смещение мембранного потенциала до величины E_c , поэтому на фоне первой ступени потенциал действия не возникает. Но в таком случае величина порогового потенциала будет меньше, чем $\Delta V_{m,1}$ и равна $\Delta V_{m,2}$. Вторая ступень вызывает смещение мембранного потенциала до величины E_c , что и приводит к возникновению потенциала действия.

На рисунке 1-46 А3 также показан прямоугольный импульс электрического тока, но его первая ступень имеет отрицательную полярность, а вторая ступень - положительную полярность. Первая ступень смещает E_m в отрицательную область. На фоне этой первой ступени потенциал действия не возникает, и тогда величина порогового потенциала будет больше, чем $\Delta V_{m,1}$, и равна $\Delta V_{m,3}$. Вторая ступень вызывает смещение мембранного потенциала до величины E_c , что и приводит к возникновению потенциала действия.

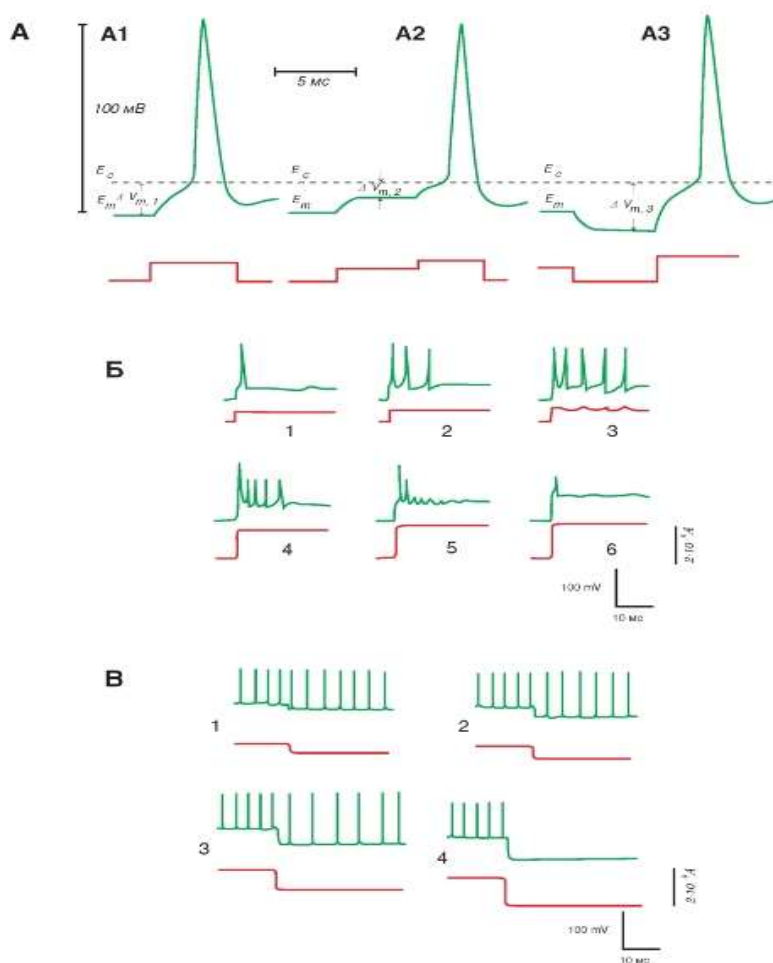
Большинство нервных клеток отвечает на деполяризацию ритмическими разрядами потенциалов действия, и наоборот, аппликация постоянного гиперполяризующего электрического тока ингибирует возникновение потенциалов действия. Рассмотрим сначала влияние деполяризующего тока, продемонстрированное на рис. 1-46 Б1. Как было показано выше, клетка отвечает генерацией потенциала действия на пороговый импульс раздражающего тока. Почему же на длительный деполяризующий импульс электрического тока возникает только один потенциал действия (см. рис. 1-46 Б1)? Дело в том, что порог для возникновения повторного ответа выше, чем для генерации одиночного потенциала действия. Основа механизма этого процесса в том, что после окончания первого потенциала действия сопротивление мембраны обычно снижено за счет высокой проводимости для ионов K^+ , поэтому раздражающий ток из порогового превращается в подпороговый. Кроме того, продолжающаяся деполяризация препятствует полному устранению инактивации Na^+ -каналов. Если эти изменения небольшие, они могут быть скомпенсированы увеличением силы тока раздражающего импульса (рис. 1-46 Б2), что приведет к появлению нескольких потенциалов действия. Еще большее

повышение силы тока приведет к генерации ритмической активности (рис. 1-46 Б3). Дальнейшее дискретное увеличение силы деполяризующего тока до определенного предела приведет к учащению ритмического разряда и увеличению числа импульсов в нем (не показано). Однако при дальнейшем увеличении силы деполяризующего тока разряд потенциалов действия укорачивается и уменьшается по амплитуде (рис. 1-46 Б4 и 5) вплоть до полного прекращения генерации потенциалов действия (рис. 1-46 Б6). Причиной этого является инактивация Na^+ -каналов.

Влияние длительного гиперполяризующего тока, продемонстрированное на рис. 1-46 В обычно рассматривают применительно к нейронам, обладающим спонтанной активностью. Увеличение гиперполяризации клетки (рис. 1-46 В1-3) приводит к уменьшению частоты спайковой активности и увеличению амплитуды потенциалов действия за счет удаления от величины критического потенциала вплоть до полного прекращения генерации этих потенциалов (рис. 1-46 В4).

Рис. 1-46. Влияние внутриклеточной поляризации на биоэлектрическую активность клеток.

А - соотношения между исходным уровнем потенциала покоя (E_m), критическим уровнем деполяризации (E_c) и пороговым потенциалом (AV_m) в норме (А1), при деполяризации (А2) и при гиперполяризации (А3). Б - влияние искусственной долго длящейся деполяризации различной силы на биоэлектрическую активность нервной клетки. В - влияние искусственной долго длящейся гиперполяризации различной силы



Механизм потенциала действия

При пороговой величине раздражающего электрического стимула возникает потенциал действия, состоящий из фаз деполяризации и реполяризации. На рисунке 1-47 А продемонстрирован потенциал действия и его фазы. Он начинается в результате смещения потенциала покоя (например, от -90 мВ) прямоугольным импульсом электрического тока до уровня критического потенциала (разного для разных типов клеток), после чего в результате изменения ионных токов меняется и сам потенциал клетки, быстро нарастая в положительную область и доходя до 0 мВ. Обычно эту фазу называют фазой деполяризации. Потенциал действия продолжает возрастать, пересекая 0 мВ и достигая значений, лежащих около $+30$ мВ (точнее, разных значений для разных типов клеток). По достижении пика величина потенциала падает в отрицательную область, вновь достигая 0 мВ. Превышение потенциала действия над нулевой линией называется овершутом. Далее потенциал действия пересекает 0 мВ и достигает значений потенциала покоя. Эту фазу обычно называют фазой реполяризации.

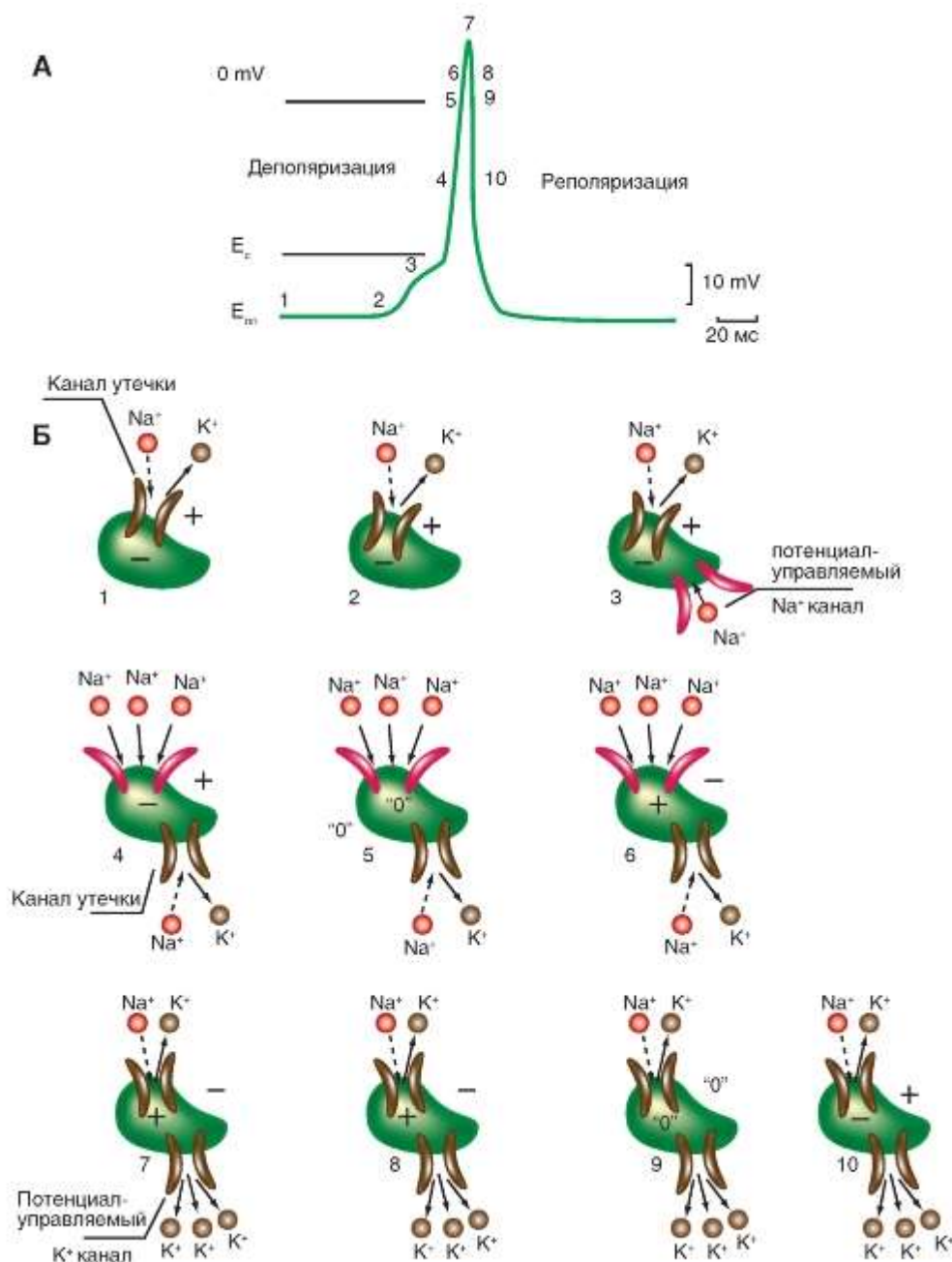
Рассмотрим в упрощенном виде связь потенциала действия с ионными токами на качественном уровне (рис. 1-47 Б).

Стадия 1 представляет собой потенциал покоя, механизм которого сводится к незначительному входу ионов Na^+ в клетку и превышающему его примерно в 100 раз выходу ионов K^+ по каналам утечки. При этом мембрана имеет внутри отрицательный заряд, а снаружи - положительный. Стадия 2 представляет собой проявление пассивного электротонического потенциала, который определяется только емкостными и резистивными свойствами мембраны и не связан с изменением ионных токов через мембрану. Стадия 3 связана с локальным ответом, при котором происходит некоторое увеличение входа ионов Na^+ в клетку, но уже через потенциалуправляемые Na^+ -каналы, что на схеме отмечено сплошной стрелкой. Выход ионов K^+ и незначительный вход ионов Na^+ по каналам утечки остается без изменений. На этой стадии клетка имеет внутри отрицательный заряд, а снаружи - положительный. Стадия 4 начинается в тот момент, когда смещаемый потенциал мембраны достигает критического уровня. Активируются (открываются) все потенциалуправляемые

Na^+ -каналы, и возникает процесс, называемый активацией входящего Na^+ -тока. Ионы Na^+ лавинообразно входят в клетку, что ведет к дальнейшему смещению мембранного потенциала, достигающего нуля. Все это время выход ионов K^+ осуществляется только по каналам утечки и остается без изменений. Клетка имеет внутри отрицательный заряд, а снаружи - положительный. Отдельно рассмотрим стадию 5, т.е. ситуацию в нуле. В этот момент потенциалуправляемые Na^+ -каналы открыты, и ионы Na^+ продолжают входить в клетку. Выход ионов K^+ , как было отмечено, остается без изменений, но в клетку вошло так много ионов Na^+ , что внутриклеточный отрицательный заряд скомпенсировался, и мембрана клетки становится электронейтральной. Тем не менее ионы Na^+ продолжают входить в клетку и вносят положительный заряд - стадия 6. В это время мембрана внутри клетки становится более электроположительной, чем снаружи. Происходит реверсия потенциала, но не реверсия натриевого электрохимического градиента. Равновесный потенциал для Na^+ равен $+55$ мВ. Потенциал смещается в положительную область и может достигнуть (у определенных клеток) величины, равной $+30$ мВ. Эта величина потенциала вызывает инактивацию потенциал-управляемых Na^+ -каналов и, соответственно, инактивацию входящего Na^+ -тока. Эти же величины потенциала вызывают активацию потенциалуправляемых K^+ -каналов и соответственно активацию выходящего K^+ -тока. Эти процессы знаменуют начало стадии 7. Поток ионов Na^+ в клетку прекращается, но из клетки интенсивно через потенциалуправляемые K^+ -каналы выходят ионы K^+ (стадия 8). На этой фазе мембрана клетки остается более электроположительной внутри клетки, чем снаружи, со стороны внеклеточной среды, хотя потенциал стремится в отрицательную область. В итоге выхода ионов K^+ мембранный потенциал уменьшается до

нуля - стадия 9. Благодаря интенсивному выходу ионов K^+ мембрана клетки вновь становится электронейтральной. Далее начинается стадия 10, при которой выход ионов K^+ приводит к тому, что потенциал клетки вновь приобретает электроотрицательность по отношению к внешней среде. Это продолжается до достижения потенциала покоя, величина которого приводит к закрытию K^+ -каналов и инаktivации выходящего K^+ -тока. Клетка возвращается в исходное состояние.

Рис. 1-47. Потенциал действия нервной клетки, его главные фазы и механизм. E_c - критический потенциал



Фазовые изменения возбудимости

В процессе потенциала действия возбудимость любой клетки меняется, что определяется механизмами, лежащими в основе генерации потенциала действия. Обычно выделяют несколько фаз, отражающих изменения возбудимости клетки в данный момент времени потенциала действия. Это фаза нормальной возбудимости, характерная для периода покоя клетки, фаза повышенной возбудимости, фаза абсолютной

рефрактерности, когда клетку возбудить невозможно, и, наконец, фаза относительной рефрактерности, когда клетка принципиально может быть возбуждена.

На рисунке 1-48 А в верхней части представлен потенциал, подобный потенциалу действия, а в нижней части синхронно показаны фазовые изменения возбудимости. Чтобы понять, как меняется возбудимость в разные фазы потенциала действия, удобно использовать тестовый импульс электрического тока прямоугольной формы и амплитудой, лежащей в диапазоне от величины потенциала покоя до критического потенциала. Если такой импульс подать на клетку на фоне потенциала покоя, ответом будет полноценный потенциал действия. Следовательно, на уровне потенциала покоя мембрана клетки имеет нормальную возбудимость (принятую условно за 100%). Далее, чтобы возбудить клетку на уровне фазы пассивного электротонического потенциала, необходим прямоугольный импульс меньшей амплитуды, а на уровне фазы локального ответа - еще меньшей амплитуды. Следовательно, синхронно с этими двумя фазами потенциала действия возбудимость станет увеличиваться. Затем начинается фаза деполяризации потенциала действия, в основе которой лежит открытие всех потенциалуправляемых Na^+ -каналов. В этот период, именно из-за активации всех потенциалуправляемых Na^+ -каналов, клетку невозможно вторично возбудить. То есть возбудимость сразу же падает до 0%, и начинается поддерживаемая фаза абсолютной рефрактерности. Эта фаза длится до того момента, пока фаза реполяризации потенциала действия не пересечет нулевую линию.

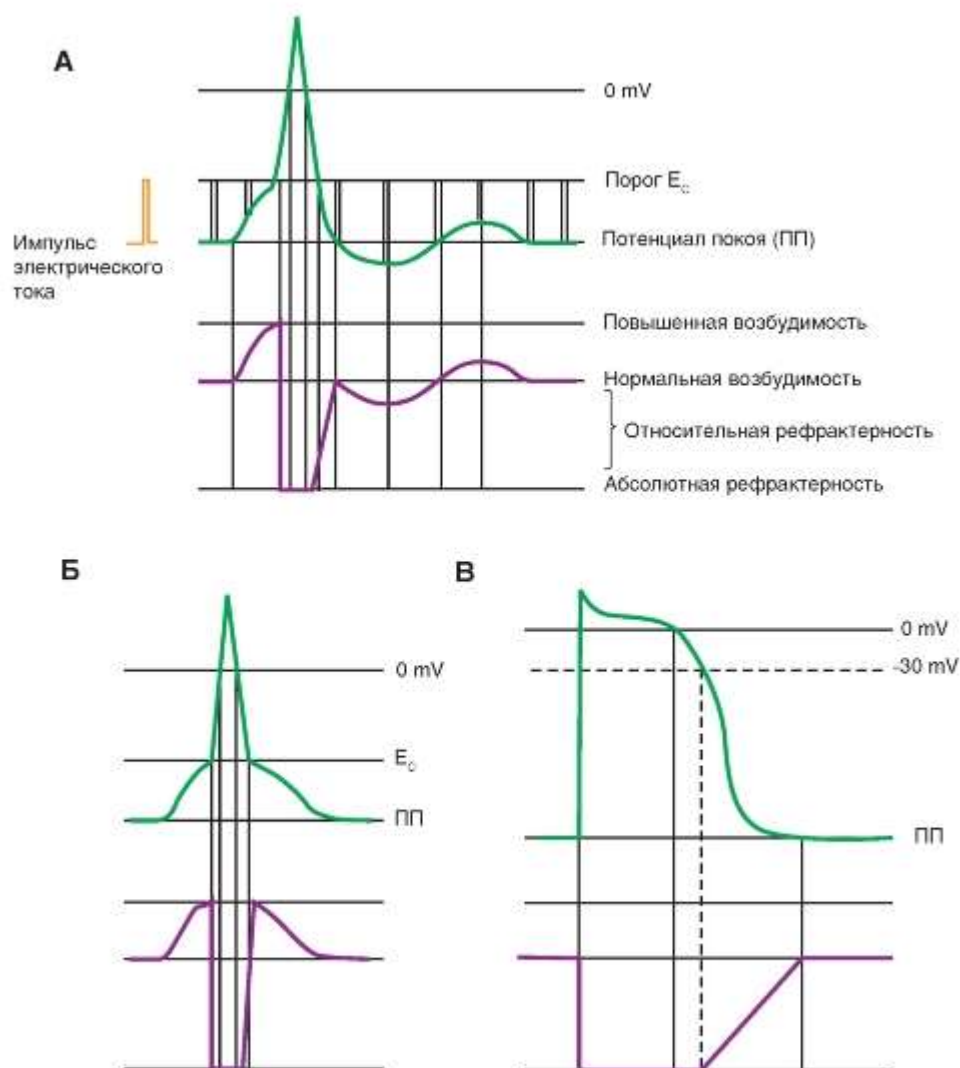
Чем ближе реполяризация потенциала действия подходит к уровню потенциала покоя, тем проще вторично вызвать процесс возбуждения мембраны клетки. Все это время мембрана клетки находится в фазе относительной рефрактерности. Наконец, реполяризация пересекает потенциал покоя. Если в этой точке подать тестовый импульс, ответом будет полноценный потенциал действия. Следовательно, при возврате к уровню потенциала покоя возбудимость станет вновь нормальной и равной 100%.

Далее для вызова процесса возбуждения на фоне нарастающей следовой гиперполяризации необходимы все большие и большие по амплитуде электрические импульсы. Следовательно, при нарастании следовой гиперполяризации возбудимость будет уменьшаться. При возврате следовой гиперполяризации к уровню потенциала покоя амплитуда импульсов, необходимых для возбуждения мембраны клетки, будет уменьшаться, пока не достигнет исходной в точке пересечения следовой гиперполяризации с уровнем потенциала покоя. Следовательно, возбудимость станет возрастать, пока не достигнет исходной величины в этой же точке.

Для того чтобы вызвать процесс возбуждения в фазу следовой деполяризации потенциала действия, необходимы все меньшие и меньшие по амплитуде электрические импульсы. Следовательно, возбудимость мембраны клетки будет повышенной. При возврате следовой деполяризации к уровню потенциала покоя амплитуда импульсов, требуемых для возбуждения мембраны клетки, станет увеличиваться, пока не достигнет исходной в точке пересечения следовой деполяризации с уровнем потенциала покоя.

Сходным образом можно описать фазовые изменения возбудимости поперечно-полосатой мышечной клетки (рис. 1-48 Б) и миокардиальной клетки (рис. 1-48 В). В последнем случае фаза относительной рефрактерности начинается позже, поскольку выход из инактивации Na^+ -каналов начинается приблизительно с -30 мВ. Разумеется, оба этих типа потенциалов действия на рисунках представлены схематично.

Рис. 1-48. Фазовые изменения возбудимости (синие кривые) и их связь с потенциалами действия (зеленые кривые) трех типов клеток: нервной (А), мышечной (Б) и миокардиальной (В). При потенциале покоя возбудимость принята за 100%. Во время фазы абсолютной рефрактерности возбудимость принята за 0%. Тестовый импульс электрического тока прямоугольной формы представлен красным цветом



Метод фиксации потенциала

На рисунке 1-49 представлены основные схемы фиксации потенциала у аксона и клеток, применяя которые можно регистрировать ионный ток. Принцип фиксации потенциала основан на том, что в известном выражении емкостной ток становится равным нулю, если V_m задать равным константе. При этом I_m становится равным I , т. е. ионный ток оказывается выведенным во внешнюю измерительную цепь.

$$I_m = I_i + C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (1.23)$$

Техническая сторона метода, позволяющего регистрировать ионный ток у аксона, представлена в виде схемы на рисунке (рис. 1-49 А). Электроды С и D связаны с входом

усилителя напряжения, и соединенный с ним осциллограф регистрирует мембранный потенциал. С помощью электронной схемы с обратной связью этот потенциал можно длительное время фиксировать (или поддерживать) на любом уровне путем пропускания тока необходимой величины между электродами *A* и *B*, поэтому он называется поддерживаемым потенциалом (*holding potential*). При помощи генератора прямоугольных импульсов электрического тока на участке мембраны его можно смещать до некоторой новой величины и удерживать на этом уровне также с помощью электронной схемы с обратной связью. Ток, протекающий через этот участок мембраны при поддерживаемом потенциале или под влиянием приложенного напряжения, измеряют отдельным усилителем тока, также подсоединенным к осциллографу. Эту характерную для экспериментов на аксонах схему применяют и в настоящее время.

Исследования методом фиксации потенциала были выполнены на изолированных клетках различных тканей. Изолированная клетка представляет собой эквипотенциальную сферу и не требует дополнительных устройств. Для осуществления такого метода применяли электронно-измерительную схему (рис. 1-49 Б) и два микроэлектрода, введенных в одну клетку. Мембранный потенциал регистрируют микроэлектродом и подают на усилитель напряжения. С помощью электронной схемы с обратной связью его можно длительное время фиксировать (или поддерживать) на любом уровне путем пропускания тока через второй микроэлектрод, поэтому этот потенциал также называется поддерживаемым (*holding potential*). С помощью генератора прямоугольных импульсов электрического тока на мембране поддерживаемый потенциал можно смещать до некоторой новой величины и удерживать на этом уровне также с помощью электронной схемы с обратной связью. Ток, протекающий через этот участок мембраны при поддерживаемом потенциале или под влиянием приложенного напряжения, измеряют отдельным усилителем.

Большим шагом вперед было создание метода внутриклеточного диализа (рис. 1-49 В1). Он позволял осуществлять полную замену внутриклеточной среды в изолированных клетках. Экспериментальную камеру посредством полиэтиленовой перегородки делили на два отсека (рис. 1-49 В2). В перегородке с помощью иглы просверливали коническое отверстие, соответствующее по размерам изучаемой клетке. Стенки поры покрывали специальным составом, к которому приклеивали подведенную микропипеткой клетку. Резкое создание в нижнем отсеке отрицательного давления разрывало часть мембраны, находящуюся с этой стороны. Таким образом, с одной стороны перегородки находилась внешняя часть мембраны, а с другой - внутренняя (рис. 1-49 В1). Каждый отсек имел автономную систему перфузии и электронно-измерительную схему.

Позднее была разработана простая в изготовлении пластиковая микропипетка с отверстием нужного диаметра на вершине для внутриклеточного диализа (рис. 1-49 Г). В результате оказываются готовыми как отверстие подведения клетки, так и контур перфузии искусственного внутриклеточного раствора: перфузирующий клетку изнутри раствор подается в одно колено микропипетки, а выводится в другое. Присасывание к клетке осуществляется благодаря отрицательному гидростатическому давлению в пипетке по отношению к среде, в которой находятся клетки. Позднее для исследований клеток стали применять упрощенную схему (рис. 1-49 Д).

Рис. 1-49. Принципы фиксации потенциала у аксона и клеток.

А - схема регистрации ионного тока у аксона. Б - схема регистрации ионного тока у клетки микроэлектродами. В - упрощенная схема регистрации ионного тока у клетки микроэлектродами. Г - схема регистрации ионного тока у клетки методом диализа. Д - пора в разделительной мембране в увеличенном размере. Е - леточный диализ при помощи пластиковых трубочек

нормализации давления в пипетке конфигурация *cell-attached* близка к физиологической ситуации, поскольку зона мембраны, захваченная пипеткой, с внутренней стороны контактирует с внутриклеточной жидкостью, а с внешней стороны - со стандартным внеклеточным раствором, которым заполняют patch-пипетку. Эта конфигурация, с одной стороны, позволяет регистрировать одиночные ионные каналы под пипеткой, а с другой, является промежуточной для других конфигураций. Она позволяет изучать на одиночном канале роль вторичных мессенджеров, включающихся через рецепторы плазматической мембраны.

Конфигурация *cell-attached* позволяет двумя путями (в зависимости от задач исследователя) сформировать конфигурацию, называемую *whole-cell*. В одном случае для ее получения в пипетку необходимо резко и одновременно подать небольшое отрицательное давление, разрывающее мембрану под пипеткой и образующее низкоомный путь между внутренней средой клетки и раствором в пипетке. При этом в мембране возникает дырка, величина которой позволяет осуществлять обмен ионов и различных соединений между пипеткой и цитоплазмой (рис. 1-50 В). В другом случае низкоомный путь между внутренней средой клетки и раствором в пипетке формируется за счет влияния соединений, находящихся в пипетке и вызывающих образование в мембране пор, проницаемых для ионов, но не для молекул. Это перфоративный (*perforated*) patch. Эта методика позволяет исследовать ионные токи, протекающие через мембрану, идентифицировать и вычленировать их.

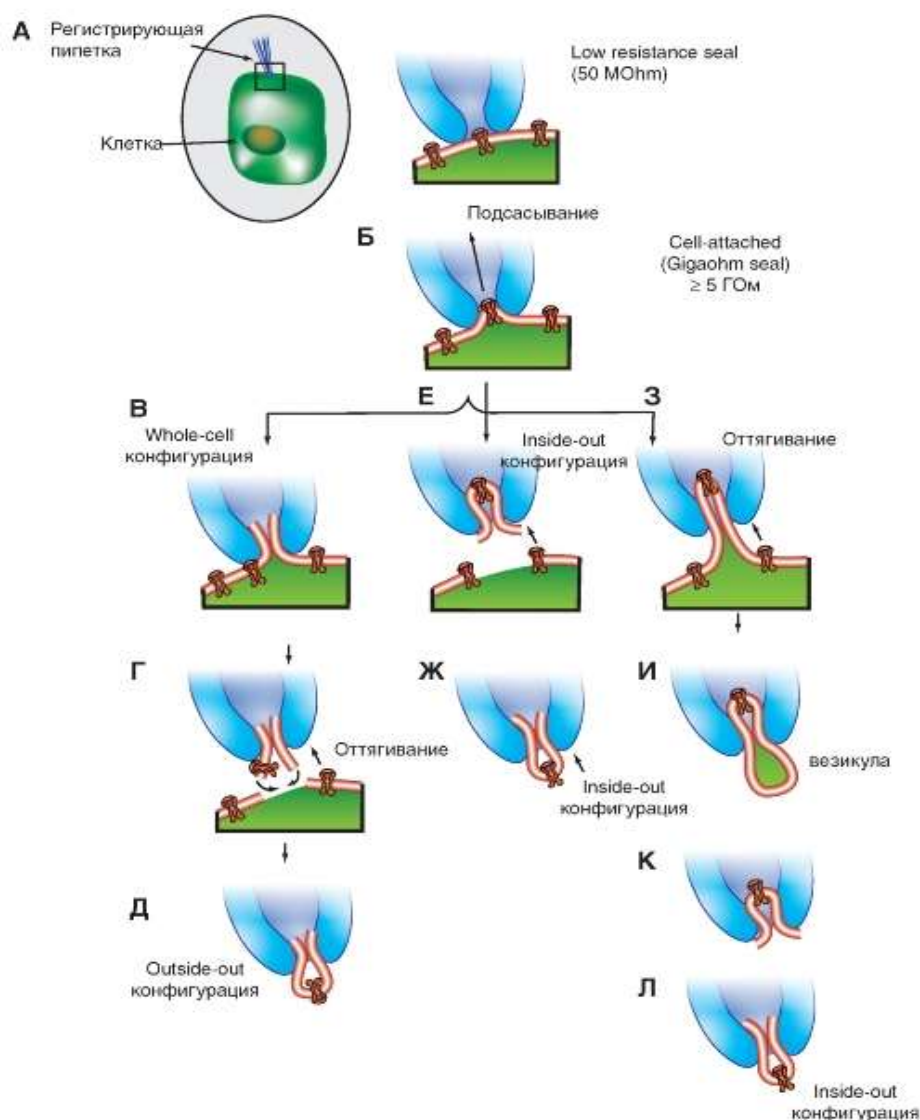
Конфигурация *whole-cell* позволяет сформировать другую конфигурацию - *outside-out patch*. Оттягивание пипетки от клетки заставляет мембрану растягиваться до тех пор, пока она не отделится от клетки (рис. 1-50 Г) и не сошьется (рис. 1-50 Д). Теперь ее внутренняя часть будет контактировать с раствором в пипетке, а внешняя - с омывающим раствором в перфузионной камере. Эту конфигурацию используют для изучения вклада соединений внешней среды клетки в активность единичных каналов.

Конфигурация *cell-attached* позволяет сформировать другую конфигурацию, называемую «*insideout patch*». К ее образованию приводит резкое отрывание пипетки от клетки (рис. 1-50 Е), причем *giga seal* не меняется. В этом случае на пипетке находится лишь фрагмент мембраны (*patch*), внутренняя сторона которой смотрит в омывающий раствор перфузионной камеры, а внешняя контактирует с содержимым пипетки (рис. 1-50 Ж). Данную конфигурацию применяют для изучения вклада соединений цитоплазмы в канальную активность.

Конфигурация *cell-attached* позволяет сформировать и изучать везикулу. Для ее образования пипетку плавно и медленно оттягивают от клетки (рис. 1-50 З). Оттягивание пипетки от клетки заставляет мембрану растягиваться до тех пор, пока она не отделится от клетки и не сошьется, образовав везикулу (рис. 1-50 И). При помощи дальнейшей экспозиции пипетки в воздухе можно получить конфигурацию *inside-out patch*

(рис. 1-50 К, Л).

Рис. 1-50. Метод *patch-clamp* и его конфигурации



Сравнение методов

На рисунке 1-51 показаны микроэлектрод (рис. 1-51 А1) и *patch-pipette* (рис. 1-51 Б1) и продемонстрированы их основные отличия. Во-первых, техническая поддержка метода *patch-clamp* позволяет исследовать клетки как в режиме фиксации тока, так и в режиме фиксации потенциала. Во-вторых, метод *patch-clamp* позволяет изучать мелкие клетки без существенного повреждения их мембран, тогда как даже один микроэлектрод, а тем более два существенно повреждают мембрану. Далее сопротивление утечки «микроэлектрод-мембрана» не превышает 500 МОм, а при использовании метода *patch-clamp* и соответственно *patch-pipette* - более 10 ГОм, что существенно влияет на качество регистрации. Наконец, микроэлектроды имеют сопротивление, достигающее 100 МОм, а *patch-pipette* - от 2 до 10 МОм, что позволяет не только качественно регистрировать потенциалы и токи клетки, но и вводить в клетки без особых проблем любые соединения.

На рисунке показан принцип фиксации тока, или *current clamp* (рис. 1-51 А2), а также принцип фиксации потенциала, или *voltage clamp* (рис. 1-51 Б2).

Применительно к рисунку (рис. 1-51 А2) липидный бислой можно уподобить конденсатору, две обкладки которого находятся на небольшом расстоянии друг от друга, и при подаче тока одна обкладка заряжается положительно, а другая - отрицательно.

Итак, если мы подаем на мембрану ток (рис. 1-51 А3), то его протекание через R_m описывается законом Ома:

$$I_R = \frac{V_m}{R_m}, \quad (1.23)$$

где V_m - потенциал на R_m .

Протекание тока через емкость можно рассчитать следующим образом:

$$I_C = C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (1.24)$$

Таким образом, для общего тока, текущего в покое через мембрану, получаем:

$$I_m = \frac{V_m}{R_m} + C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (1.25)$$

Емкостной компонент мембраны C_m обусловлен исключительно липидным бислоем, а резистивный компонент R_m - белками, образующими ионные каналы и встроенными в липидный бислой.

Если подать на мембрану прямоугольный импульс электрического тока, кривая изменения потенциала будет определяться $R_m \times C_m$

Применительно к рис. 1-51 Б2 можно фиксировать потенциал и разрешить течь току.

Если внезапно менять напряжение от исходного значения до нового (в виде прямоугольного импульса; рис. 1-51 Б3), то быстро проходящий емкостной ток (I_c) течет по тому же принципу, как заряды текут на конденсатор. I_c максимален в начале прямоугольного импульса, когда заряд на конденсатор течет наиболее быстро, и затем уменьшается по экспоненте с постоянной времени RC . Если внезапно уменьшить напряжение до его исходного значения, I_c течет в противоположном направлении, по сравнению с регистрируемым в начале импульса. Таким образом, I_c появляется в виде коротких пиков в начале и в конце прямоугольного импульса. Изменение знака напряжения объясняется изменением направления тока в момент его прекращения, т.е. сначала происходит заряд, а затем разряд емкости, что связано с изменением на противоположное направление тока в цепи.

Итак, если V_m поддерживать постоянным, то I_c будет течь только очень короткое время, лишь в самый момент сдвига мембранного потенциала до нового значения. Затем этот ток прекратится, поскольку величина dV_m/dt (скорость изменения мембранного потенциала) будет равна нулю. При этом мембранный ток становится простой функцией мембранной проводимости (g_m) и напряжения (V_m):

$$I_m = g_m V_m \quad (1.26)$$

Ток, который должен подаваться усилителем обратной связи для поддержания заданной величины мембранного потенциала, в точности равен общему мембранному току, протекающему при данном мембранном потенциале через участок мембраны, на

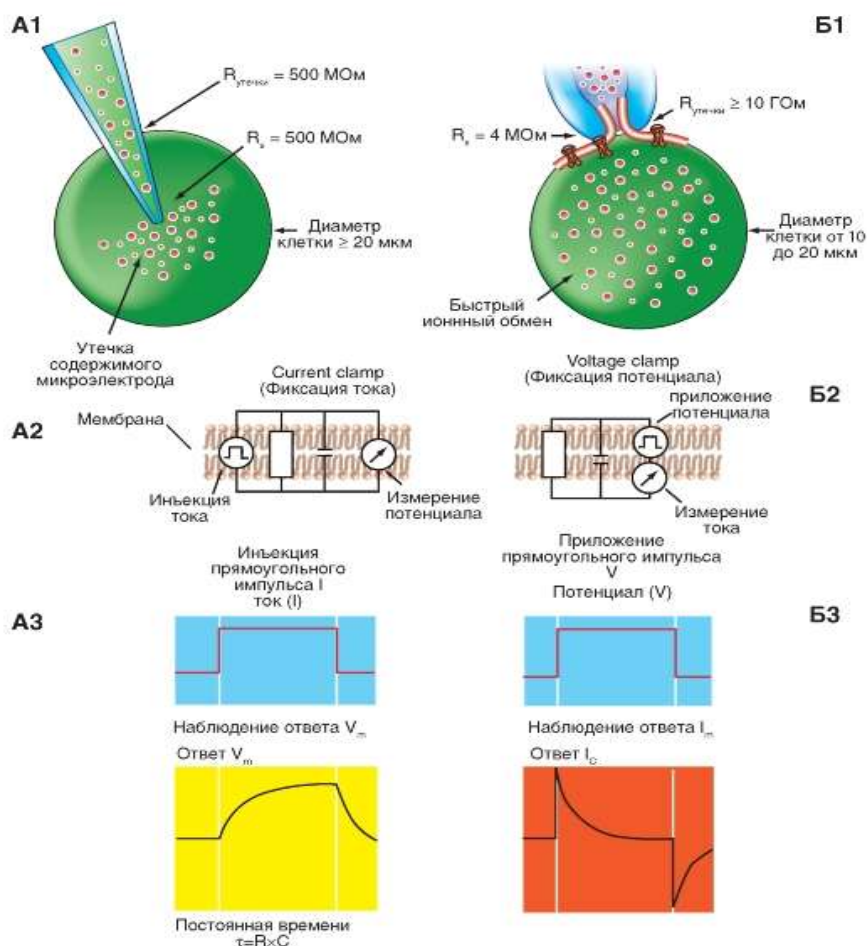
котором напряжение фиксировано. Эти токи позволяют оценивать изменения общей ионной проводимости (а отсюда и специфических ионных проводимостей), вызываемые изменением мембранного потенциала.

В целом, метод был основан на том, что в известном выражении

$$I_m = I_i + C_m \frac{dV_m}{dt} \quad (1.27)$$

емкостной ток становится равным нулю, если V_m задать равным константе. При этом I_m становится равным I_i , т.е. ионный ток оказывается выведенным во внешнюю измерительную цепь.

Рис. 1-51. Сравнение методов регистрации с помощью обычного микроэлектрода (А) и с помощью *patch-pipette* (Б)



Ионные токи

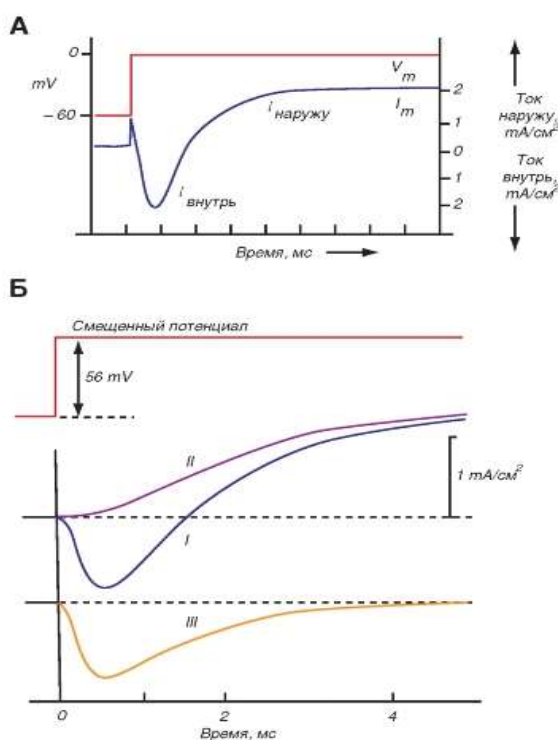
Результат применения метода фиксации потенциала представлен на рис. 1-52 А. На мембране поддерживается определенный потенциал (*holding potential*), равный, например, -60 мВ. Если с помощью прямоугольного импульса электрического тока сместить мембранный потенциал (деполяризовать мембрану) до 0 мВ, то в зарегистрированном токе можно различить три отдельные фазы. Вначале наблюдается так называемый емкостной ток, т.е. мгновенный пик тока (выделен зеленым цветом), направленного

наружу, который обусловлен разрядом мембранной емкости. Поскольку она оказывается полностью разряженной, последующий ток определяют ионы, проходящие через ионные каналы. Вторая фаза представляет собой ток, направленный внутрь клетки (входящий ток I_{in}), т.е. вход катионов в цитозоль через ионные каналы мембраны. Эта фаза относительно кратковременна и переходит в третью фазу тока, который течет из клетки (выходящий ток I_{out}) до тех пор, пока импульс электрического тока поддерживает деполяризацию мембраны.

Если мембрана резко деполяризована (рис. 1-52 Б), общий ионный ток (т.е. текущий после почти мгновенного разряда емкости) состоит из двух фаз - входящего и исходящего токов (синяя кривая). Поскольку ионный ток определяется ионами Na^+ и K^+ и зависит от их концентраций, то, изменяя концентрацию этих ионов, его можно разделить на компоненты. Было установлено, что если все ионы Na^+ , находящиеся во внешней среде, заменить на холин, который не проходит через мембрану, то входящий ток будет отсутствовать (коричневая кривая). Следовательно, он обусловлен ионами Na^+ . В этом случае исходящий ток приписывали ионам K^+ . Сначала ионы Na^+ движутся по концентрационному градиенту, создавая входящий ток. Однако эта компонента быстро уменьшается и сменяется исходящим K^+ -током.

Рис. 1-52. Ионные токи, зарегистрированные методом фиксации потенциала.

А - ток, протекающий через мембрану (синяя кривая) при смещении потенциала до 0 мВ относительно поддерживаемого потенциала, равного -60 мВ (поддерживаемый и стимулирующий ток выделен красным цветом). Б - разделение мембранного тока (I_m) на калиевую и натриевую компоненты: 1 - аксон находится в физиологическом растворе, $I = I_{Na} + I_K$; 2 - натрий заменен на холин, $I = I_K$; 3 - разность между 1 и 2, $I = I_{Na}$. Отклонение кривой вниз соответствует входящему току, а вверх соответствует исходящему току. Поддерживаемый потенциал мембраны клетки и его смещение обозначены красной кривой



Регистрация ионных токов методом фиксации потенциала

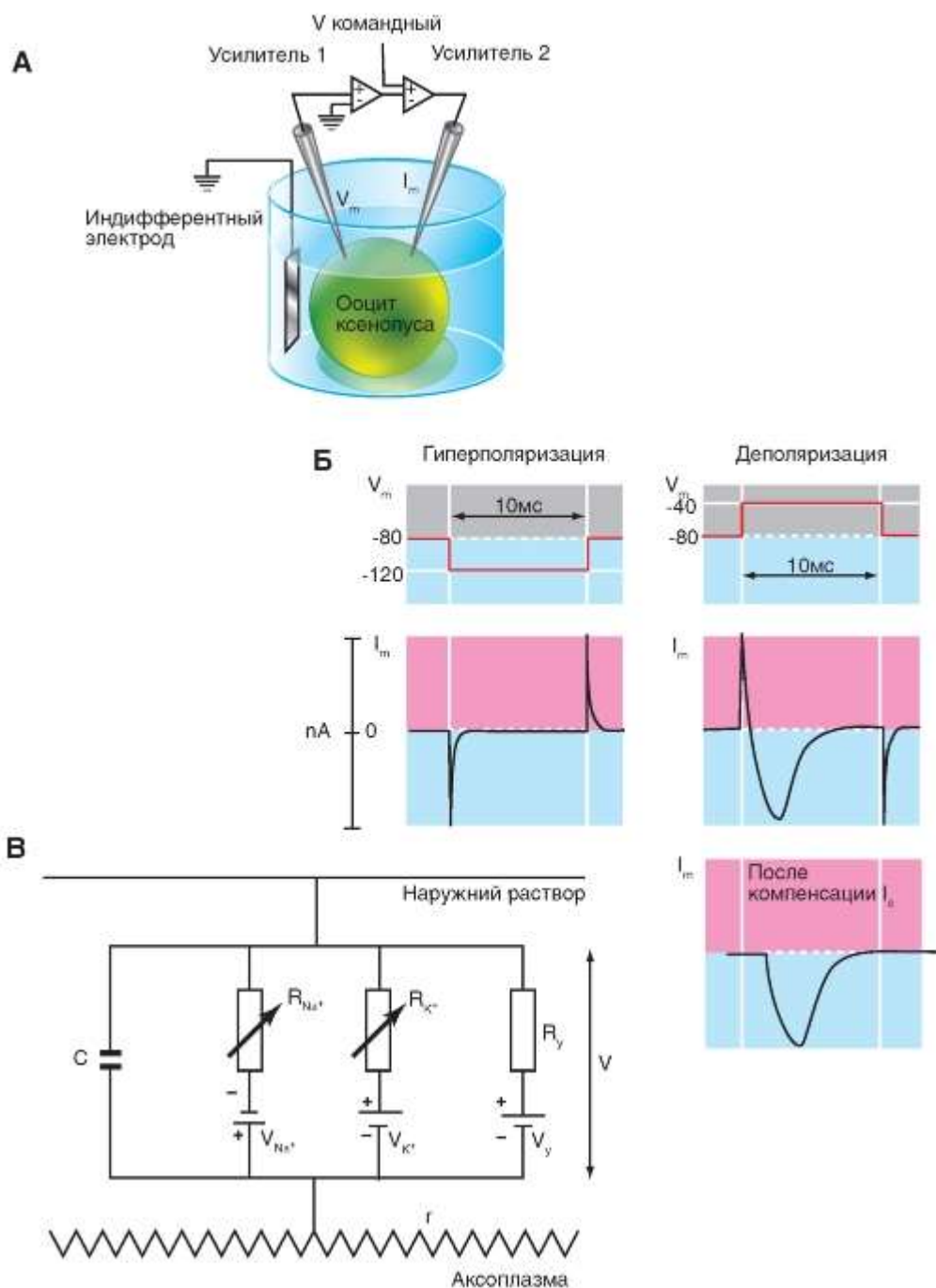
На рисунке 1-53 А представлен принцип регистрации тока при фиксации потенциала на клетке. Мембранный потенциал регистрируется микроэлектродом и подается на усилитель напряжения. С помощью электронной схемы с обратной связью его можно длительное время фиксировать (или поддерживать) на любом уровне путем пропускания тока через второй микроэлектрод, поэтому этот потенциал также называют поддерживаемым (*holding potential*). При помощи генератора прямоугольных импульсов электрического тока на мембране поддерживаемый потенциал можно смещать до некоторой новой величины и удерживать на этом уровне также с помощью электронной схемы с обратной связью. Ток, протекающий через этот участок мембраны при поддерживаемом потенциале или под влиянием приложенного напряжения, измеряют отдельным усилителем.

На рисунке 1-53 Б показаны примеры регистрации при типичных экспериментах с фиксацией потенциала у ооцита, в который экспрессированы потенциалуправляемые Na^+ -каналы. В этих экспериментах потенциал поддерживается на уровне -80 мВ. В первой части экспериментов тестирующая ступенька длиной 10 мс смещает потенциал от -80 до -120 мВ и вновь возвращает его к -80 мВ. В этом случае регистрируют только короткие емкостные пики в начале и в конце прямоугольного импульса. В промежутке между емкостными пиками, т.е. на фоне самой ступеньки, не регистрируются никакие другие токи. Во второй части экспериментов тестирующая ступенька длиной 10 мс смещает потенциал от -80 мВ до -40 мВ и вновь возвращает его к -80 мВ. В этом случае в промежутке между емкостными пиками, т.е. на фоне самой ступеньки, регистрируется входящий ток. Этот ионный ток, протекающий через экспрессированные в ооцит потенциалуправляемые Na^+ -каналы. Часто этот ток называют макроскопическим, поскольку он протекает через большую популяцию каналов в целой клетке.

Для понимания механизма удобно рассмотреть электрическую модель аксона. На рисунке 1-53 В сопротивление r представляет собой сопротивление осевого электрода, связывающего разные участки мембраны. Предположим, что моделируемый аксон находится в большом объеме раствора, так что наружная жидкость эквипотенциальна и на схеме может быть представлена проводником без сопротивления. На рисунке показан один элемент мембраны, а следует представить себе большое число аналогичных элементов, связанных между собой и образующих непрерывный кабель. Каждый элемент содержит емкость мембраны C , калиевую и натриевую батареи E_K и E_{Na} и сопротивления R_K и R_{Na} . Сопротивление утечки R_l и батарея E_l введены для учета движения ионов, проходящих по каналам, которые не изменяются во время активности. Однако ток утечки мал, и в первом приближении его можно не принимать во внимание.

Рис. 1-53. Двухэлектродный метод фиксации потенциала.

А - схема опыта. Б - регистрируемые токи на фоне гиперполяризации и деполяризации. В - эквивалентная электрическая схема элемента возбудимой мембраны аксона. Обозначения: r - сопротивление осевого электрода, введенного в аксон; C - емкость мембраны; V_K - калиевая батарея; R_K - сопротивление K^+ -канала; V_{Na} - натриевая батарея; R_{Na} - сопротивление Na^+ -канала; R_l - сопротивление утечки; V_l - батарея утечки



Na^+ - и K^+ - проводимость

Зная величину калиевого и натриевого тока, нетрудно оценить проводимость мембраны для каждого иона. При подпороговых значениях деполяризации выходящий калиевый ток больше входящего натриевого, что препятствует достижению мембранным потенциалом порога.

Как только входящий Na^+ -ток хотя бы слегка превысит выходящий K^+ -ток, мембранный потенциал неизбежно начнет смещаться регенеративным образом в сторону E_{Na} .

Зная величину калиевого и натриевого тока, можно оценить проводимость мембраны для каждого иона. На рисунке 1-54 А показаны изменения проводимости, вызванные быстрым смещением потенциала внутри волокна до 0 мВ относительно поддерживаемого

потенциала, равного -56 мВ. Смещение мембранного потенциала до нуля эквивалентно короткому замыканию мембраны. В этом случае конденсатор C сразу разряжается, и с этого момента ток создают только ионы, проходящие по каналам, имеющим сопротивление R_{Na} и R_K .

Натриевая проводимость (g_{Na}) в ответ на смещение мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала изменяется от крайне низкой величины и быстро нарастает, а затем экспоненциально уменьшается. Это экспоненциальное уменьшение g_{Na} может быть быстрым или медленным, что определяется длительностью ступеньки деполяризации. Если смещение потенциала относительно поддерживаемого потенциала (например, потенциала покоя) было кратковременным (как это показано красной пунктирной линией; рис. 1-54 А, красная кривая, импульс 1), и потенциал покоя был быстро восстановлен, g_{Na} быстро возвращается к состоянию покоя (пунктирная красная кривая). Если сразу же подать второй аналогичный импульс, вызывающий смещение потенциала относительно поддерживаемого потенциала, то это также вызывает аналогичное увеличение g_{Na} . Если же деполяризация продолжительна (рис. 1-54 А, красная кривая, импульс 2 или 3), g_{Na} быстро увеличивается, но уменьшается более медленно (рис. 1-54 А, сплошная кривая) вследствие процесса, называемого инактивацией. В этом случае, чтобы второй импульс после инактивации натриевых каналов мог снова вызвать изменение проницаемости для натрия, мембрана в течение нескольких миллисекунд до нанесения этого импульса должна быть реполяризована. Что же касается калиевой проводимости (g_K), то во всяком случае в аксоне кальмара не обнаружено инактивации, и высокая g_K сохраняется все время, пока мембрана деполяризована. Так, если смещение потенциала относительно поддерживаемого потенциала было не очень длительным (рис. 1-54 А, красная кривая, импульс 2), высокая g_K сохраняется до возвращения потенциала к поддерживаемому потенциалу (рис. 1-54 А, пунктирная коричневая кривая). Если же смещение потенциала относительно поддерживаемого потенциала было длительным (рис. 1-54 А, красная кривая, импульс 3), высокая g_K сохраняется все время, пока мембрана деполяризована (рис. 1-54 А, сплошная коричневая кривая).

Калиевая проводимость (g_K) нарастает от небольшой, но вполне определенной величины. Это изменение начинается не сразу. Кривая увеличения g_K имеет S-образную форму, и проводимость выходит на постоянный уровень через 5-6 мс. Задержанный сдвиг g_K достигает максимума, и это начинает возвращать мембранный потенциал к уровню потенциала покоя (а часто сдвигает его и несколько дальше этого уровня). Кроме того, приходит в действие другой независимый механизм: деполяризация мембраны вызывает также (с задержкой) инактивацию g_{Na} , что тоже способствует возвращению мембранного потенциала к уровню потенциала покоя.

Таким образом, деполяризация гигантского аксона кальмара запускает три процесса:

быстрое нарастание g_{Na} ;

- задержанное нарастание калиевой проводимости, которая не инактивируется (но выключается при реполяризации мембраны);

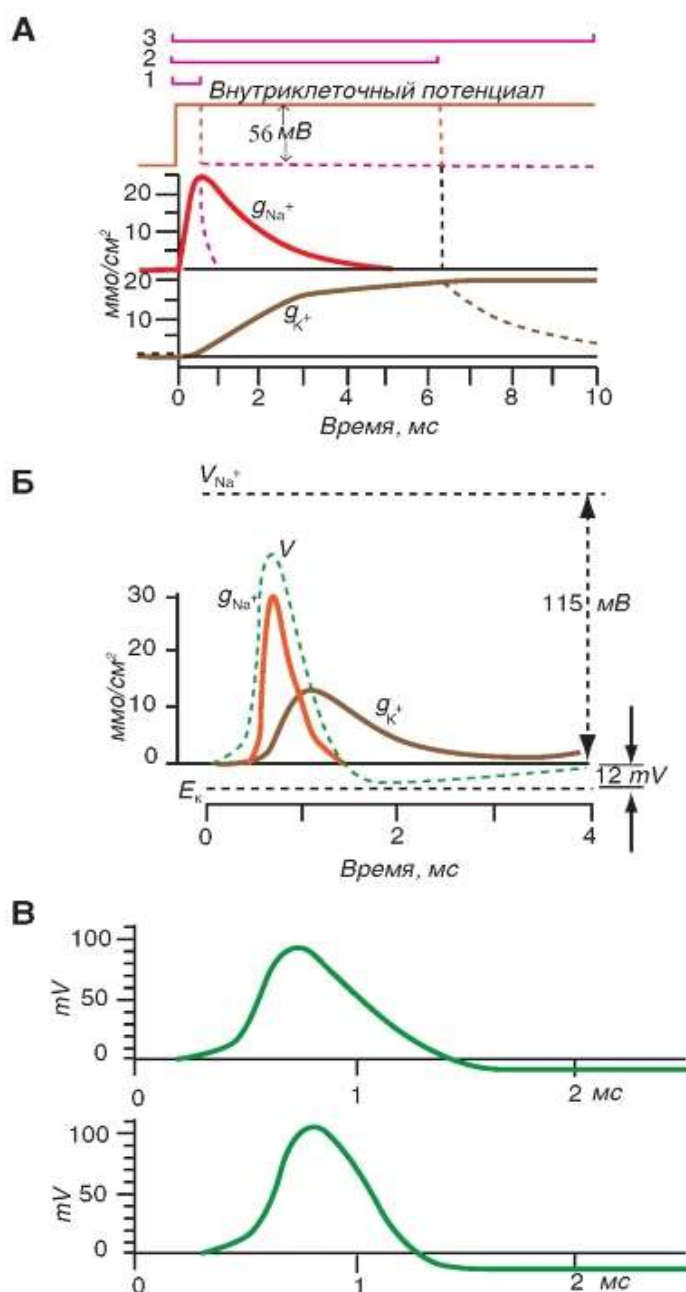
- задержанную инактивацию g_{Na} (рис. 1-54 А, Б). Рассчитанные значения потенциала действия

(А.Л. Ходжкин и А.Ф. Хаксли) были похожи на зарегистрированный потенциал действия (рис. 1-54 В).

Рис. 1-54. Натриевая и калиевая проводимости и теоретическая реконструкция потенциала действия.

А - изменения во времени g_{Na} и g_K при деполяризации на 56 мВ, т.е. от поддерживаемого потенциала, равного -56 мВ, до 0 мВ. Поддерживаемый потенциал

мембраны клетки и его смещение обозначены красной кривой, g_{Na} и g_K - бордовой и коричневыми кривыми соответственно. Сплошными линиями обозначены продолжительная деполяризация и изменения g_{Na} и g_K в этом случае; пунктирными линиями показаны изменения g_{Na} и g_K в ответ на более короткие ступени деполяризации g_{Na} и g_K . Б - рассчитанные изменения g_{Na} и g_K при развитии потенциала действия (V). В - сравнение рассчитанного потенциала действия (В1) с реальным потенциалом действия, зарегистрированным в гигантском аксоне кальмара (В2). Рассчитанная скорость проведения потенциала действия составляла 18,8 м/с, а полученная в эксперименте - 21,2 м/с



* мо — применяемая в первой половине XX века единица проводимости равная 1/Ом (Ω). В настоящее время сименс (S).

Токи при разных ступеньках потенциала

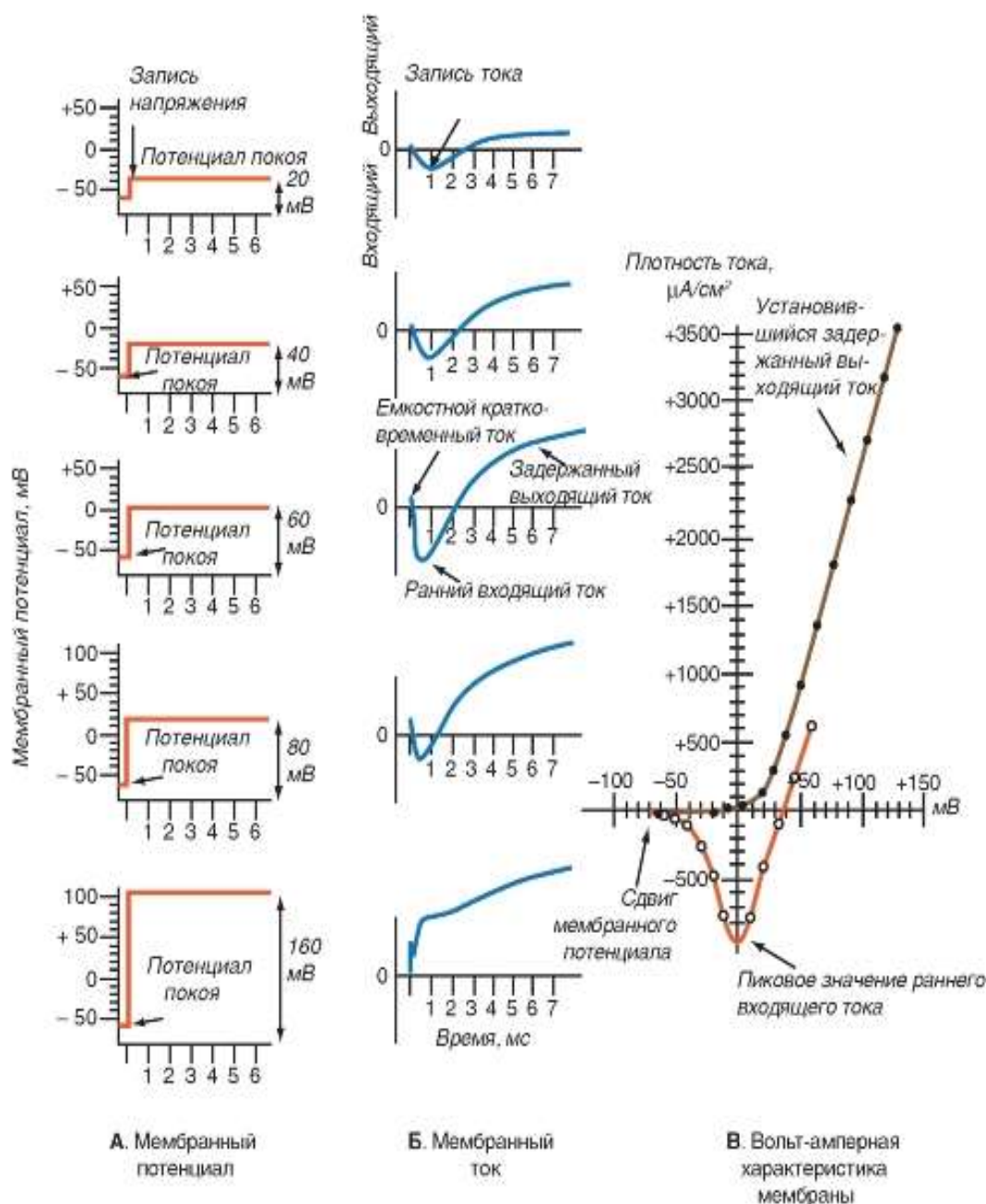
Рассмотрим ответ мембраны клетки на ступенчатое смещение мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала (потенциала покоя). Пусть мембранный потенциал поддерживается на величине -60 мВ, равной величине потенциала покоя клетки. В этом случае мы не регистрируем ни входящего, ни выходящего тока, и прибор, регистрирующий ток, будет показывать нулевую линию. Теперь ступенчато сместим поддерживаемый потенциал на 20 мВ в сторону деполяризации (рис. 1-55 А - верхний фрагмент). На приборе, регистрирующем текущий через мембрану ток, можно будет увидеть осцилляцию нулевой линии, включающую отклонение тока в отрицательное направление (т.е. входящий ток) и последующее отклонение в положительном (т.е. выходящий ток) (рис. 1-55 Б - верхний фрагмент). Однако и входящий, и выходящий токи при подобном смещении мембранного потенциала малы. Теперь ступенчато сместим поддерживаемый потенциал на 40 мВ в сторону деполяризации. На приборе можно будет видеть увеличение амплитуд входящего и выходящего токов. Сместим поддерживаемый потенциал на 60 мВ, т.е. до 0 мВ. На приборе мы увидим максимальное увеличение амплитуды входящего и выходящего токов. При более высоких величинах деполяризации входящий ток становится меньше и при смещении мембранного потенциала от 110 до 120 мВ, сдвигающей потенциал мембраны в зону от $+50$ до $+60$ мВ, обращается в нуль (до потенциала реверсии). Если смещение потенциала будет еще больше (на 160 мВ), входящий ток изменит знак и будет течь наружу. Выходящий ток с увеличением ступенек ведет себя противоположным образом: по мере того как мембрана все больше деполяризуется, он увеличивается. Выходящий ток уменьшается только тогда, когда мембранный потенциал изменяется в сторону гиперполяризации (после того как вначале он был быстро сдвинут в сторону деполяризации ступенькой порядка 84 мВ). Потенциал реверсии для выходящего тока равен около -80 мВ. Изменения входящего и выходящего токов в зависимости от мембранного потенциала легко представить в виде вольтамперных характеристик (рис. 1-55 В). На этих графиках пики входящего тока и установившиеся значения выходящего откладываются по оси абсцисс как функции смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала. Как видно из таких графиков, деполяризующие ступеньки активируют как входящий, так и выходящий токи. Вначале с увеличением деполяризации оба тока увеличиваются по амплитуде. Затем входящий ток уменьшается и при деполяризующих ступеньках более 110 мВ меняет знак.

Входящий ток объясняется тем, что в результате увеличения g_{Na} , вызываемого деполяризацией, ионы Na^+ устремляются внутрь клетки. Исходя из увеличения g_{Na} , этот ток прекращается при $+55$ мВ - потенциале равновесия Нернста для Na^+ (E_{Na}). При E_{Na} сила, обусловленная электрическим потенциалом, равна по величине и противоположна по направлению силе, создаваемой градиентом концентрации, так что суммарного натриевого тока нет. При еще большей деполяризации первая из этих сил становится больше второй, и ионы Na^+ начинают выходить из клетки наружу, тем самым изменяя направление тока. Подобным образом особенности выходящего тока определяются тем, что его носителями служат ионы K^+ . По мере деполяризации мембраны силы электрического поля, стремящиеся удержать K^+ внутри клетки, уменьшаются, приводя ко все большему преобладанию направленных наружу сил, обусловленных градиентом концентрации K^+ .

Рис. 1-55. Фиксация потенциала на гигантском аксоне кальмара.

А - смещения мембранного потенциала во времени относительно поддерживаемого потенциала. Б - ток через мембрану, регистрируемый одновременно со смещением потенциала. Показаны только смещения потенциала в положительную область от уровня поддерживаемого потенциала, равного -60 мВ (например, потенциала покоя). В - вольтамперные характеристики, полученные в результате экспериментов с фиксацией

потенциала. По оси абсцисс - смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала (в данном случае потенциала покоя); по оси ординат - изменения входящего Na^+ -тока (фиолетовая кривая) и выходящего K^+ -тока (коричневая кривая)



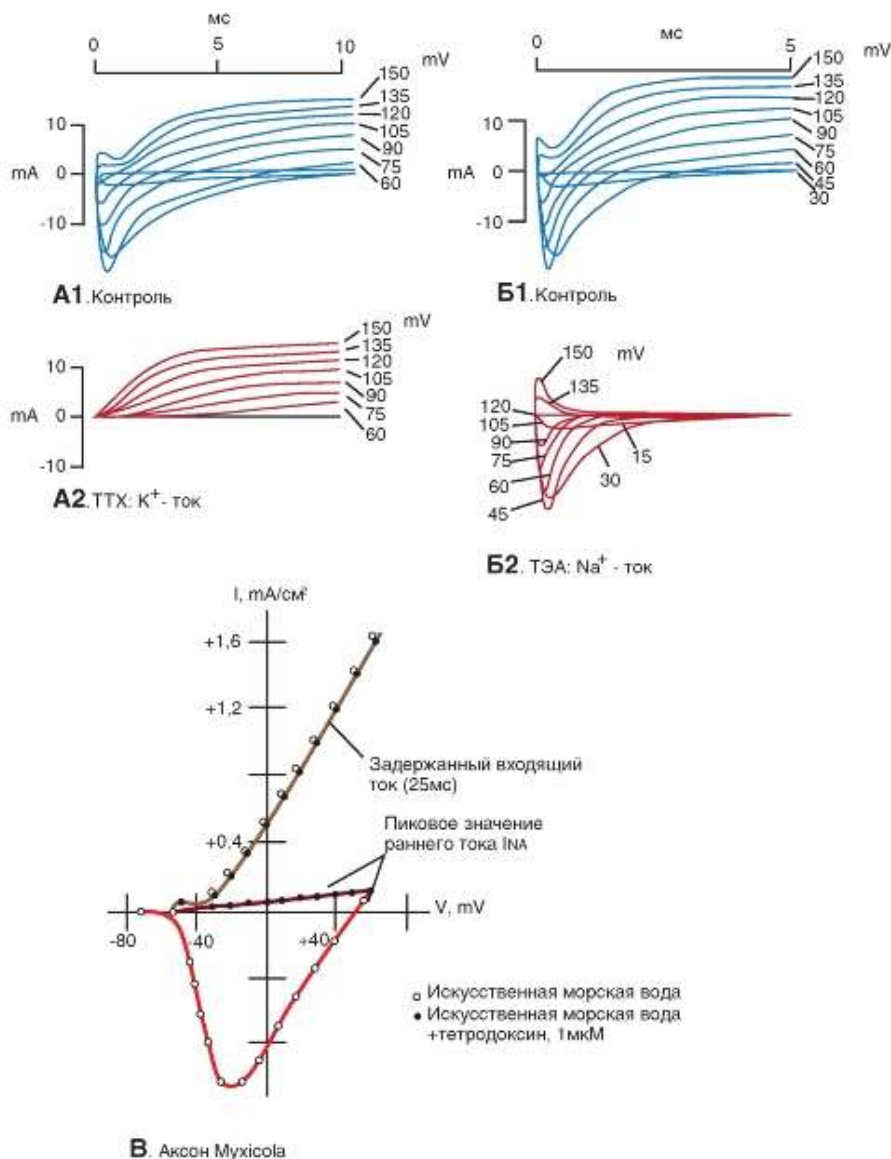
Основные блокаторы Na^+ - и K^+ -токов ТТХ и ТЭА

Эксперименты с заменой ионов и полученные результаты требовали независимых исследований с селективным блокированием различных ионных каналов. Эти поиски увенчались успехом, и сходные кривые были получены, когда вместо замены ионов применяли высокоселективные соединения, блокирующие ионные каналы. Например, при введении в перфузионный раствор, окружающий клетку, тетродотоксина (ТТХ) - яда японской рыбы иглобрюха - он воздействует только на нарастание g_{Na} , происходящее при деполяризации мембраны. Его эффект крайне специфичен. ТТХ не влияет на калиевую

проводимость, более того, он даже не особенно подавляет функцию тех натриевых каналов, которые действуют в покое мембране (а также каналов, активируемых медиаторами) (рис. 1-56 А). ТТХ блокирует только повышенную проводимость g_{Na} , появляющуюся при деполяризации. Другое вещество - тетраэтиламмоний (ТЭА) - подавляет калиевую проводимость, возрастающую при деполяризации, но только тогда, когда введено внутрь аксона (рис. 1-56 Б); оно не влияет на g_{Na} . Избирательность действия фармакологических соединений позволила установить и другие детали. Например, когда внутрь аксона вводят проназу - фермент, расщепляющий белки, - она избирательно нарушает инактивацию g_{Na} . После обработки аксона проназой натриевый ток нарастает обычным образом, но потом не спадает: он остается большим в течение всего времени деполяризации. Первый сделанный из этого вывод заключался в том, что включение и выключение g_{Na} - это два независимых процесса. Второй вывод основывался на следующей дополнительной информации, известной биохимикам. Проназа представляет собой комплекс из 11 ферментов. Последовательное введение каждого из них в клетку показало, что к избирательному нарушению инактивации g_{Na} приводит только введение В-щелочной протеазы. Поскольку она селективно отщепляет аргинин от белковой цепочки, было постулировано, что инактивационные ворота Na^+ -канала представляют собой аргинин.

Рис. 1-56. Избирательное блокирование натриевых и калиевых каналов с помощью тетродотоксина и тетраэтиламмония.

В первой части рисунка представлены наложенные друг на друга 7-9 записей, сделанных в условиях фиксации потенциала (на уровнях от 30 до 150 мВ) на одном перехвате Ранвье седалищного нерва лягушки. На записях цифрами показаны смещения мембранного потенциала от поддерживаемого потенциала (в данном случае потенциала покоя, равного около -75 мВ), кратные 15 мВ. Входящий ток направлен вниз, а выходящий вверх. Поскольку площадь мембраны перехвата, на которой фиксировали напряжение, нельзя определить точно, указана сила тока (в наноамперах), а не плотность тока. В нижней части рисунка представлены вольтамперные характеристики измеряемых токов. А - изменение тока во времени в опыте с обычным солевым раствором (А1) и в присутствии тетродотоксина (А2). Тетродотоксин блокирует ту часть общего мембранного тока, которая переносится ионами Na^+ , но не K^+ , т.е. входящий натриевый ток, оставляя без изменений выходящий калиевый ток (Hille, 1976). Б - изменение тока во времени в опыте с нормальным солевым раствором (Б1) и в присутствии тетраэтиламмония (Б2). Влияние тетраэтиламмония на ток показывает, что это соединение блокирует калиевый, но не натриевый ток. (По Hille, 1976, с изменениями) В - вольтамперные характеристики гигантского аксона *Myxicola*, показывающие I_{Na} (белые кружечки) и I_K (белые треугольники) в контрольных условиях и демонстрирующие, что тетродотоксин (1 мкМ) блокирует I_{Na} (черные кружечки), но не I_K (черные треугольники). Точки - ионные токи во время ступенек напряжения от уровня поддерживаемого потенциала до указанного уровня



Na^+ -токи

Рассмотрим Na^+ -токи, зарегистрированные методом *voltage-clamp*. На рисунке 1-57 А продемонстрированы Na^+ -токи, зарегистрированные у ряда электровозбудимых клеток при различных величинах смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала. Величины поддерживаемых потенциалов в этом случае не приводятся, поскольку они различные для клеток разных тканей. Однако приводятся величины смещений мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала, при которых входящий Na^+ -ток максимален, и величины, при которых максимален инвертированный Na^+ -ток (т.е. ток, изменивший свое направление). Разумеется, фаза деполяризации потенциала действия лежит в том диапазоне

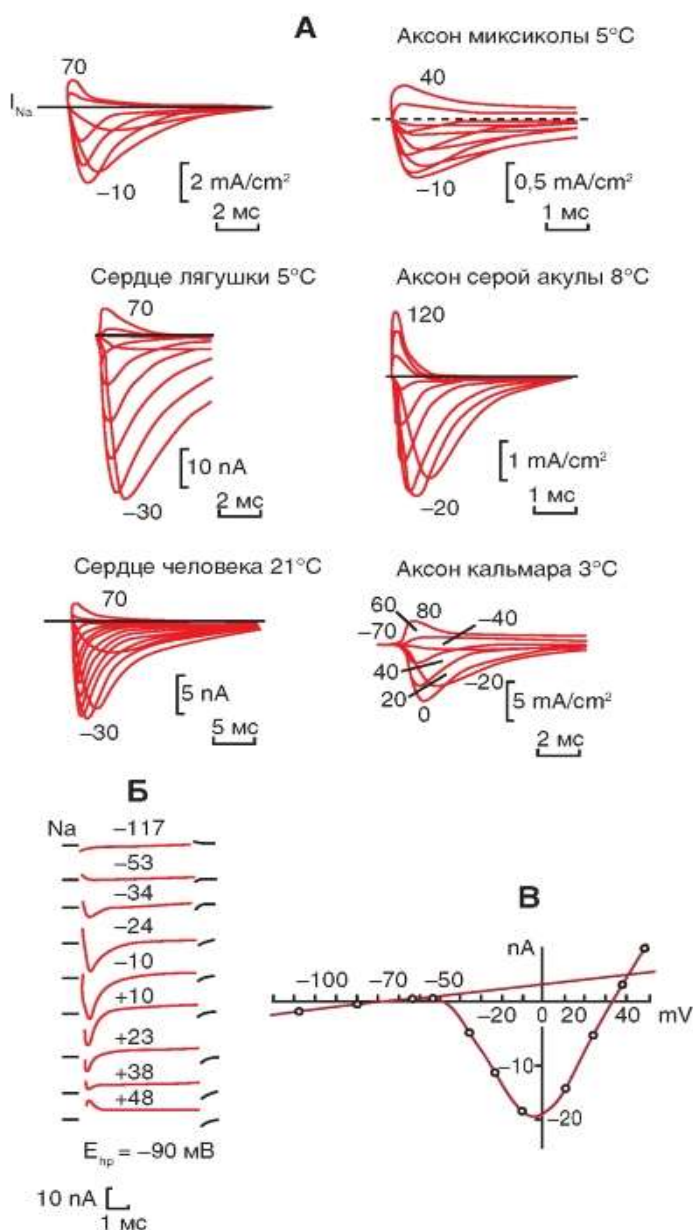
потенциалов, при которых Na^+ -ток имеет входящее направление. Выходящее направление этого тока в естественных условиях не встречается, а присутствует только в условиях значительных смещений мембранного потенциала в эксперименте, что позволяет охарактеризовать проводимость каналов при всех возможных уровнях смещения потенциала.

На рисунке 1-57 Б представлена запись Na^+ -токов при смещении мембранного потенциала относительно величины поддерживаемого потенциала. Величина поддерживаемого потенциала E_{hp} равна -90 мВ. На основании результатов экспериментов

по пиковым значениям и по стационарным значениям токов, представленных на рисунке 1-57 Б, были построены вольтамперные характеристики (рис. 1-57 В), типичные для Na^+ -токов.

Рис. 1-57. Na^+ -токи, зарегистрированные в конфигурации *whole-cell* у электровозбудимых клеток при различных величинах смещения мембранного потенциала относительно поддерживаемого потенциала. K^+ -каналы были ингибированы Cs, тетраэтиламмонием или 4-аминопиридином.

А - Na^+ -токи, зарегистрированные у разных электровозбудимых клеток. Б - Na^+ -токи, зарегистрированные при разных ступенках относительно поддерживаемого потенциала. Величина поддерживаемого потенциала E_h равна -90 мВ. Величины ступенек тестирующих потенциалов указаны на рисунке. В - вольтамперные характеристики, построенные по пиковым значениям (о) и по стационарным значениям (Δ) Na^+ -токов



Активация и инактивация Na^+ -токов

Корректное описание инактивации входящих токов представляет определенные сложности, поскольку этот процесс развивается во времени параллельно с развитием выходящих K^+ -токов. Поэтому регистрируемый спад тока может быть не истинным, а определяться наложением на входящий ток одновременно развивающихся выходящих K^+ -токов. Для предотвращения подобных ошибок необходимо тщательно блокировать K^+ -токи. Их наличие в наиболее простой форме можно определить по амплитуде входящего тока в конце достаточно длинного по времени стимула. В этом случае она будет слегка превышать «нулевую» линию ($Y_0 > 0$). Здесь следует отметить, что превышение «нулевой» линии в конце стимула может также отражать очень медленную (константа времени значительно больше длительности стимула) инактивацию исследуемого входящего тока. Именно поэтому во избежании возможных ошибок сложный динамический процесс инактивации сводят к стационарной (*steady-state*) инактивации.

В этом случае измеряют уменьшение максимальной величины тока, вызванного тестирующими деполяризующими ступеньками в случае, если перед этим мембранный потенциал определенное (достаточно длинное по сравнению с длительностью инактивации) время поддерживался на сниженном уровне. Зависимость этого уменьшения от величины поддерживаемого потенциала носит S-образную форму. При этом для характеристики каналов помимо амплитуды тока (I) обычно рассматривают величину активации (V_a) и величину инактивации (V_h). Если сущность постоянных времени активации и инактивации каналов достаточно понятна, то величины активации (V_a) и инактивации (V_h) требуют пояснения.

На рисунке 1-58 показаны принципы исследования активации и инактивации тока.

На панели А данного рисунка представлены тестовые сигналы и *steady-state* активация I_T . Мембрана клетки была на поддерживаемом потенциале -100 мВ в течение 1 с, и токи выявляли с помощью деполяризующих шагов-ступенек. На панели Б показана активационная кривая, полученная на основании уравнения Больцмана в следующей форме:

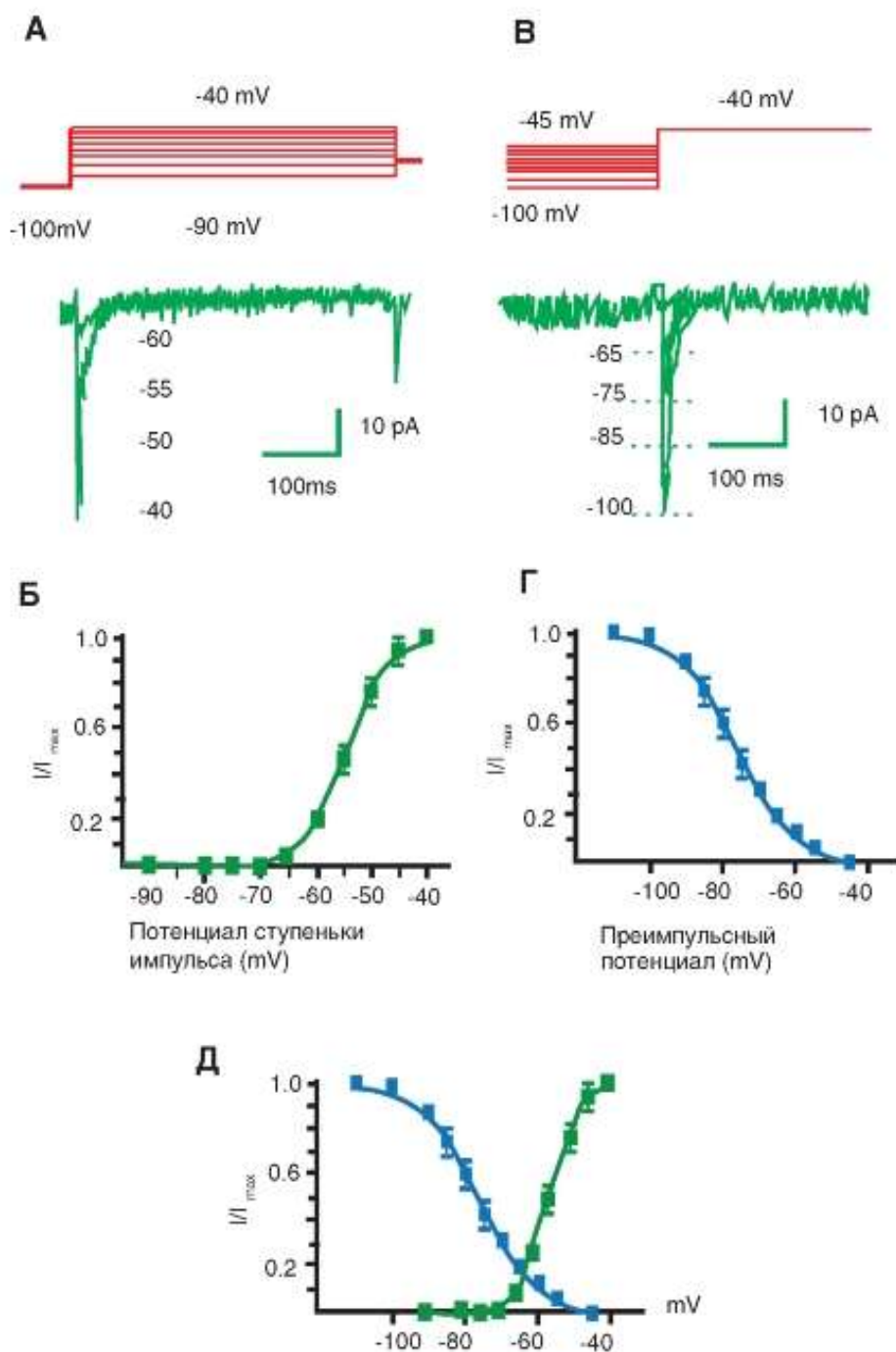
$$I/I_{\max} = 1/[1 + \exp(-(V - V_{0,5})/k)], \quad (1.28)$$

где I представляет собой амплитуду тока, I_{\max} является максимальной амплитудой тока, V - тестовый потенциал, $V_{0,5}$ - потенциал полуактивации или иначе V_a . На панели В рисунка представлены тестовые сигналы и *steady-state* инактивация тока. Мембрана клетки была на поддерживаемом потенциале в диапазоне от -110 до -45 мВ в течение 1 с, и токи выявляли при помощи деполяризующих шагов-ступенек до -40 мВ. На панели Г показана инактивационная кривая, полученная на основании уравнения Больцмана в следующей форме:

$$I/I_{\max} = 1/[1 + \exp((V - V_{0,5})/k)], \quad (1.29)$$

где I представляет собой амплитуду тока, I_{\max} является максимальной амплитудой тока, V - потенциал, $V_{0,5}$ - потенциал полуинактивации или иначе V_h . И в случае (Б), и в случае (Г) константа k представляет собой наклон кривой (фактор крутизны) и отражает *steady-state* потенциалчувствительность каналов или «диапазон» потенциалов, в котором каналы функциональны. Чем больше k , тем уже диапазон. В части рисунка (Д) кривые на панелях Б и Г объединены вместе.

Рис. 1-58. Принципы регистрации и анализа активации и инактивации тока



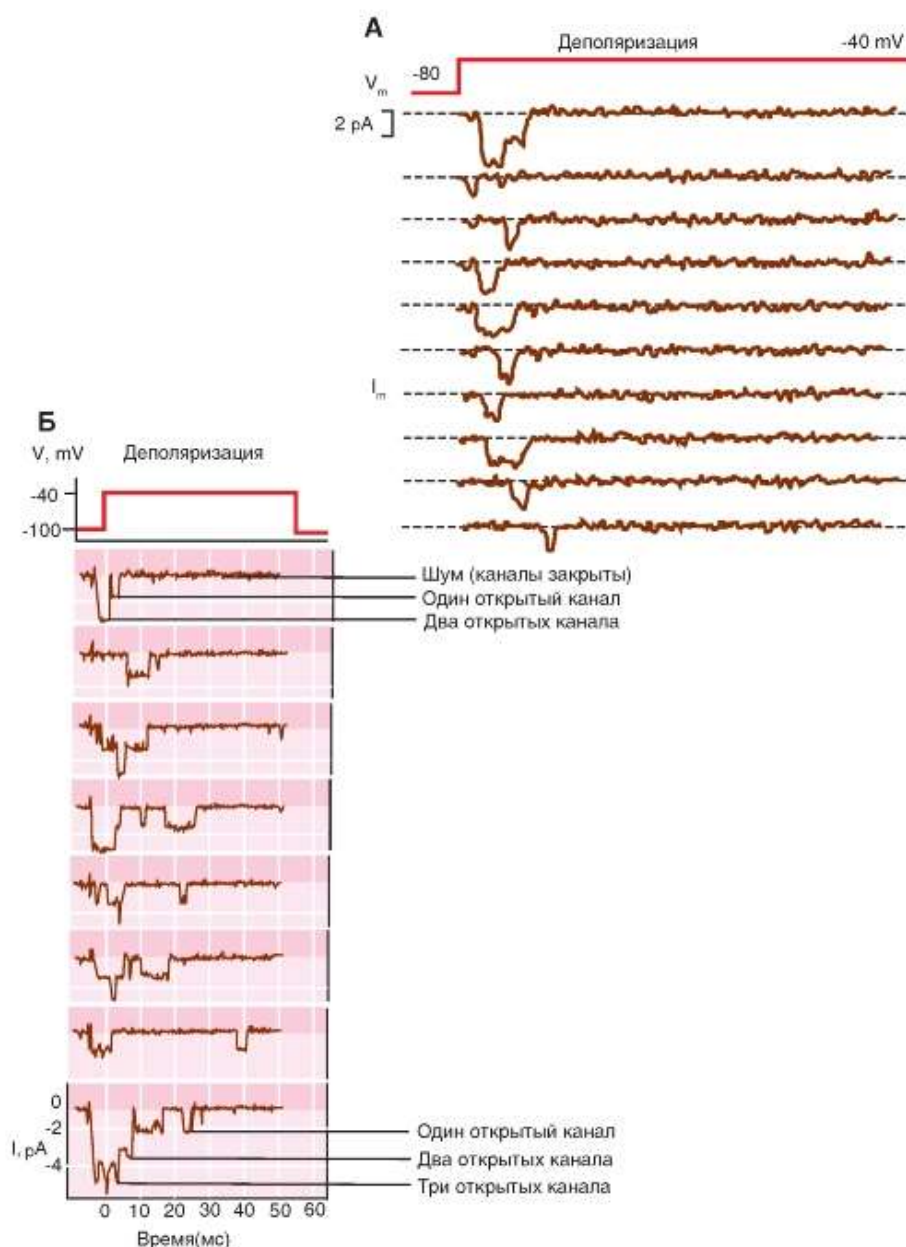
Na⁺-каналы

В настоящее время известно 9 типов Na⁺-каналов. Рисунок 1-59 А демонстрирует одиночные Na⁺- каналы, зарегистрированные методом *patch-clamp* в конфигурации *cell-attached*. Ток через канал возникает при смещениях мембранного потенциала от -80 мВ (поддерживаемый потенциал) до -40 мВ. Открытое состояние Na⁺-каналов характеризуется смещением нулевой линии вниз, и это свидетельствует о том, что через канал течет входящий Na⁺-ток. Рисунок 1-59 Б демонстрирует открытое состояние одного, двух или трех Na⁺-каналов.

На рис. 1-59 А показано 10 регистраций одиночного натриевого канала в ответ на стимуляцию деполяризационной тестовой ступенькой потенциала (цитозольная сторона *patch* электроотрицательна) в одном и том же эксперименте.

Н рис. 1-59 Б показано 8 регистраций одиночного натриевого канала в ответ на стимуляцию деполяризационной тестовой ступенькой потенциала (цитозольная сторона *patch* электроотрицательна) в одном и том же эксперименте, выполненном методом *patch-clamp* (записи одного и того же канала).

Рис. 1-59. Na^+ -ток через одиночный Na^+ -канал в мышечной клетке мыши. А - Регистрация методом *patch-clamp* в конфигурации *cell-attached* одиночных ионных каналов при смещениях мембранного потенциала от -80 до -40 мВ. Открытое состояние Na^+ -каналов представлено в виде смещения нулевой линии вниз, т.е. через канал течет входящий Na^+ -ток. Б - Регистрация методом *patch-clamp* в конфигурации *outside-out* одиночных ионных каналов при смещениях мембранного потенциала от -100 до -40 мВ



Параметры Na^+ -тока

Микроскопические механизмы, то есть механизмы на уровне токов, текущих через одиночные каналы, лежащие в основе макроскопических вольт-амперных характеристик, то есть процессов, происходящих на уровне токов, текущих через целую клетку.

На рис. 1-60 А линия обозначает вольт-амперную зависимость идеализированного открытого натриевого канала. Т.к. мы исходим из начальной предпосылки, что канал в нашем случае будет полностью открыт все время (т.е. что проводимость каналов не будет функцией напряжения) тогда ток, текущий через них, будет линейным или «омическим».

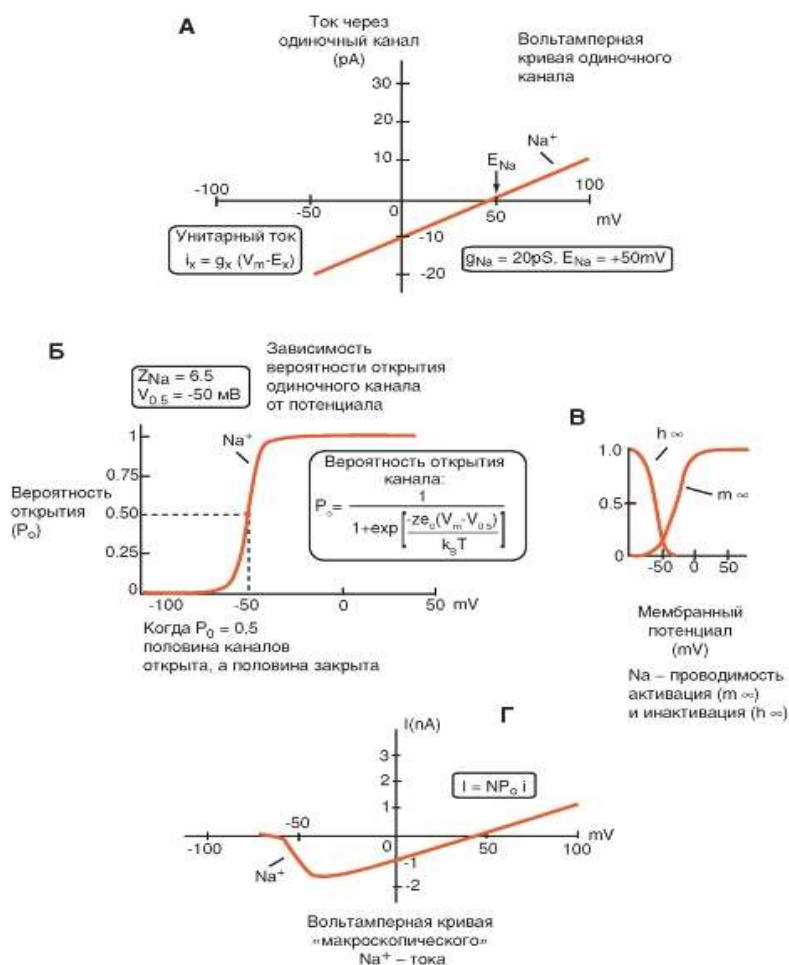
На рис. 1-60 Б представлена кривая, которая показывает вероятность того, что натриевый канал будет находиться в открытом состоянии (вероятность открытия натриевого канала). Уравнение, приведенное во вставке в рисунок, означает приведенную кривую, если мы вставим значения

$$Z_{Na} = 6.5 \text{ и } V_{0.5} = -50 \text{ mV.}$$

На рис. 1-60 В параметр m описывает вероятность того, что каждая из трех частей в натриевом канале находится в необходимом состоянии для того, что бы канал открылся. Параметр h описывает вероятность того, что инактивирующая часть натриевого канала находится в необходимом состоянии для того, что бы канал открылся (т.е. не будет инактивировать его). Таким образом, высокие значения параметра h располагают к тому, чтобы канал был в открытом состоянии. Параметры, отложенные на рисунке - это значения m и h на бесконечном промежутке времени.

На рис. 1-60 Г представлена оценка макроскопического натриевого тока посредством умножения одноканальных токов из секции А рисунка на вероятность их открытия P_o из секции Б и на количество каналов (N). В данном случае мы устанавливаем количества каналов в 100 натриевых.

Рис. 1-60. Параметры Na^+ -тока, протекающего через целую клетку и через одиночные ионные каналы



Места связывания токсинов у Na^+ -канала

Большое количество биологических токсинов оказывают свой токсический эффект, модифицируя свойства Na^+ -каналов. Они включают:

- растворимые в воде гетероциклические гуанидиновые соединения: ТТХ и сакситоксин (saxitoxin, STX);
- липидорастворимые полициклические соединения: вератридин, аконитин и батрахотоксин (batrachotoxin, BTX);
- яды, представляющие собой низкомолекулярные полипептиды, изолированные из скорпиона, морских анемонов и многих других.

После появления данных об этих участках В. Hille предложил наглядную схему взаимодействия токсинов с белком канала (рис. 1-61). Эта схема и до настоящего времени позволяет читателям, не обладающим специальной молекулярно-биологической подготовкой, понять, в каком месте канала происходит взаимодействие с теми или иными токсинами.

Все фармакологические соединения, действующие на Na^+ -каналы, имеют места или участки связывания на α -субъединице. Были идентифицированы, по крайней мере, шесть отличающихся мест связывания для нейротоксинов и один участок связывания для местных анестетиков и сходных с ними веществ, которые представлены в таблице (рис. 1-61).

Место связывания 1 связывает непептидные блокаторы поры Na^+ -каналов - ТТХ, STX и пептидный блокатор поры μ -конотоксин. Рецепторные участки для этих токсинов сформированы аминокислотными остатками в петле поры и непосредственно на внеклеточной стороне петли поры с внешней стороны.

Место связывания 2 связывает семейство липидорастворимых токсинов, включающих аконитин (aconitine, AC), вератридин (veratridine, VER), BTX и граянотоксин (grayanotoxin, GTX), которые поддерживают активацию натриевых каналов. Фотоафинная маркировка и исследования мутагенеза демонстрируют трансмембранные сегменты IS6 и IVS6 в рецепторном участке для BTX.

Место связывания 3 связывает α -токсин скорпиона и токсины морских анемонов, которые ингибируют инактивацию Na^+ -каналов, замедляя переход Na^+ -каналов, находящихся в активированном состоянии, к состоянию их инактивации. Эти пептидные токсины связываются в комплексном рецепторном участке, включающем петлю между сегментами S3-S4 на внешнем конце S4 сегмента в домене IV.

Место связывания 4 связывает β -токсины скорпиона, которые увеличивают активацию каналов. Рецепторный участок для β -токсина скорпиона включает петлю, соединяющую сегменты S3-S4 на внеклеточном конце сенсора напряжения сегмента S4 в домене II.

Место связывания 5 связывает комплекс полиэфирных токсинов - бреветоксинов (brevetoxin, PbTx) и CTX (ciguatoxin), которые продуцируют морские планктонные формы *dinoflagellates*. В экспериментах с фотоафинной меткой было показано, что трансмембранные сегменты IS6 и IVS5 обеспечивают связывание PbTx.

Место связывания 6 связывает пиретроиды, представляющие собой аналоги природных нейротоксинов приретринов, 4,4-дихлордифенил-трихлорэтан и δ -конотоксины, которые замедляют скорость инактивации подобно α -токсину скорпиона. Местоположение нейротоксинового рецепторного участка 6 неизвестно.

Наконец, местные анестетики и вещества, родственные антиэпилептикам, и антиаритмические вещества связывают перекрывающиеся рецепторные участки, расположенные во внутренней полости поры натриевого канала. Аминокислотные остатки в сегментах S6, по крайней мере в трех из четырех доменов, вносят вклад в этот сложный комплекс рецепторного участка к соединению, при этом доминирующую роль играет IVS6-сегмент.

Рис. 1-61. Места связывания токсинов с различными доменами и сегментами потенциалуправляемых натриевых каналов, посредством которых реализуется физиологический эффект

Места связывания токсинов у потенциал-управляемых Na⁺-каналов

Место связывания	Токсины	Домены и сегменты	Физиологический эффект
Место связывания 1	Тетродотоксин (tetrodotoxin) Сакситоксин (saxitoxin) μ-Конотоксин (p-conotoxin)	IS2-S6, IIS2-S6, IIIS2-S6, IVS2-S6	Блок ионного канала => ингибирование ионного транспорта
Место связывания 2	Вератридин (veratridine) Батрахотоксин (batrachotoxin) Гваянотоксин (grayanotoxin) Аконитин (aconitine)	IS6, IVS6	Постоянная активация
Место связывания 3	α-Токсины скорпиона (α- scorpion toxins), Токсины морских анемонов (sea anemone toxins), δ-Atracotoxins	IS5-IS6, IVS3-S4, IVS5-S6	Медленная инактивация; усиление постоянной активации
Место связывания 4	β-токсины скорпиона (β-scorpion toxins)	IIS1-S2, IIS3-S4	Временная повторяющаяся проходящая активность и блок => смещение потенциал-зависимой активации в более негативные потенциалы
Место связывания 5	Бреветоксин (brevetoxins) Цигуатоксин (ciguatoxins)	IS6, IVS5	Повторяющаяся активность; постоянная активация => смещение потенциал-зависимой активации в более негативные потенциалы
Место связывания 6 ?	δ-конотоксин (δ-Conotoxin), Пиретроиды (Pyrethroids), ДДТ (DDT)	Не установлены	Повторяющаяся активность и/или блок; замедление активации, инактивация и деактивация
Место связывания для местных анестетиков	Местные анестетики, Антиаритмические препараты, Антиэпилептические препараты, DPI 201-106	IS6, IIIS6, IVS6	Продление потенциала действия. Блок ионного канала

Центр связывания 1 у Na⁺-канала

Первые два (рис. 1-62 А) естественно встречающихся токсина, вероятно, лучше всего исследованы в качестве модификаторов Na⁺-каналов. ТТХ - сильнейший яд (LD₅₀ 0,1 мг/кг), найденный в яичниках и печени и в меньшем количестве в кишечнике и коже рыбы фугу и родственных ей рыб из семейства *Tetraodontidae*. Сама рыба не синтезирует ТТХ, но вместо этого концентрирует его из заглатываемых бактерий. Рестораны в Японии и Корее подают рыбу фугу как деликатес после удаления ядовитых органов. Однако много

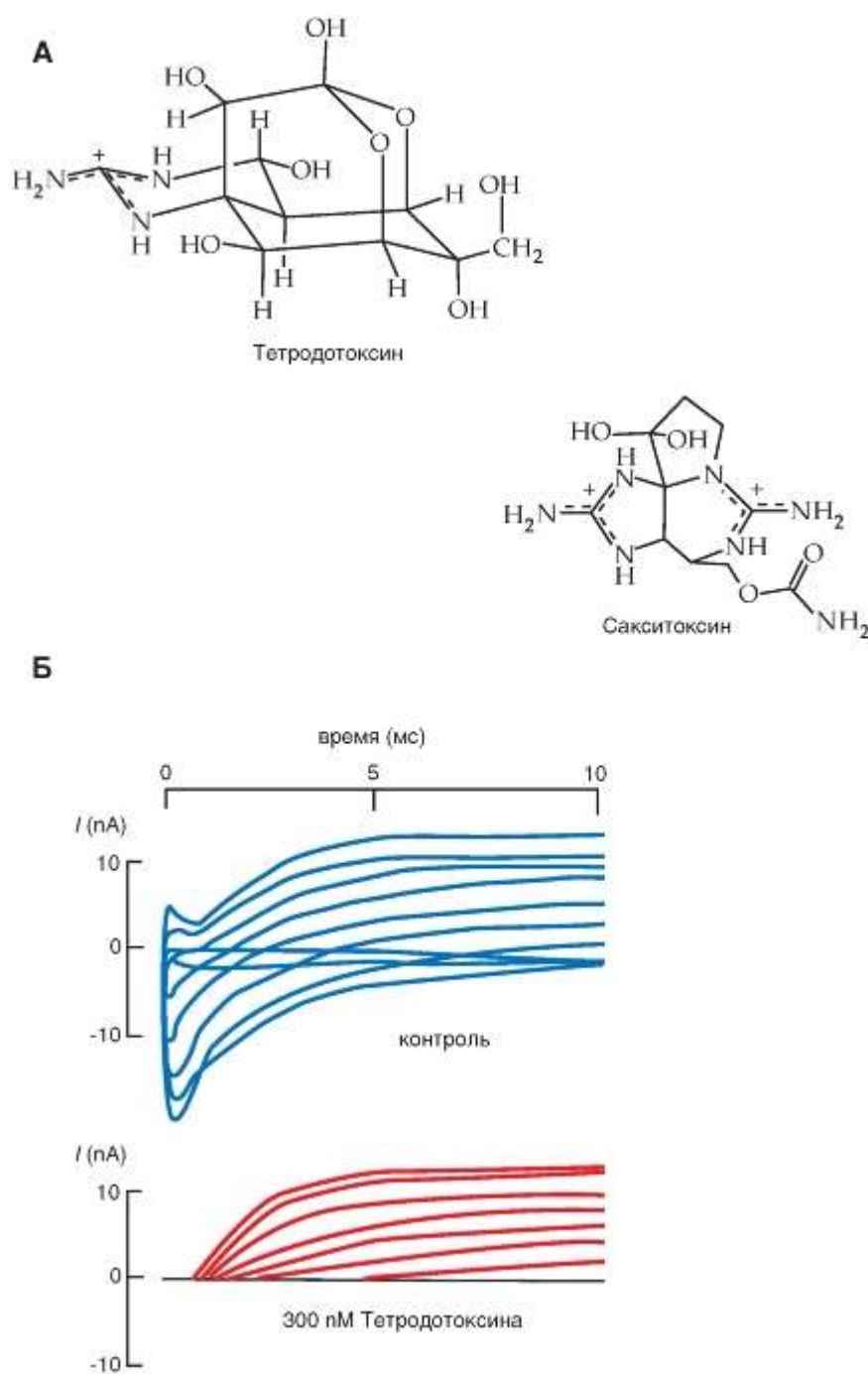
фатальных случаев происходит каждый год в пределах от Новой Гвинеи до Японии, Таиланда и Вьетнама. По некоторым оценкам, общее количество смертных случаев составляет 120 в год. Кроме того, есть интересная энтологически-фармакологическая связь между отравлением ТТХ и колдовским фольклором на Гаити. ТТХ представляет собой главный активный фармакологический компонент, ответственный за введение человека в состояние каталепсии - оцепенения. ТТХ был выделен из порошка, используемого в колдовских ритуалах, который был приготовлен методами экстракции из различных животных (рыбы, лягушки) и растений.

STX, подобно ТТХ, относится к блокаторам активации Na^+ -каналов и известен так же, как паралитический яд моллюска (PSP: *paralytic shellfish poison*). Этот токсин, найденный в некоторых моллюсках, членистоногих, иглокожих и некоторых других морских животных, заглатывающих протистов (простейших одноклеточных организмов), главным образом *Dinoflagellata* - одноклеточный организм в морском планктоне, который содержит яд. Кроме того, STX представляет собой продукт некоторых пресноводных *Cyanobacteria*. Этим способом фильтрующие корм ракушки, рыбы или моллюски становятся ядовитыми и могут вызвать паралитическое ракушечно-рыбное отравление при потреблении пищи домашними животными и человеком.

ТТХ и STX, возможно, наиболее специфичные токсины для Na^+ -каналов. В большинстве случаев связывание быстро обратимо (секунды и минуты) и высокоафинно. Их равновесная константа диссоциации K_d лежит в диапазоне 1-10 нМ для изоформ скелетной мышцы или нервных клеток, а для менее чувствительных сердечных Na^+ -каналов - в диапазоне нескольких мкМ. Два гуанидиновых токсина и их структурные аналоги оказались ценными инструментами как для исследования формы и структуры внешнего устья, так и для моделирования ТТХ- и STX-связывающего участка. Изучение связывания с STX предполагает, что также β_1 -субъединица участвует в формировании ТТХ/STX связывающего участка. На рисунке 1-62 показано ингибирующее действие ТТХ на Na^+ -ток.

Рис. 1-62. Блокаторы участка связывания 1 тетродотоксин, сакситоксин и μ -конотоксин, блокирующие проводимость ионов.

А - химическая структура блокаторов поры Na^+ -каналов - тетродотоксина и сакситоксина. Б - типичное блокирующее действие тетродотоксина на Na^+ -ток. Суммарный ток, включающий входящий Na^+ -ток и выходящий ток, возникающий при разных ступенях деполяризации относительно поддерживаемого потенциала (Б1). Полное ингибирование входящего Na^+ -тока тетродотоксином в концентрации 300 нМ (Б2)



Центр связывания 2 у Na^+ -канала

Представители группы липидорастворимых соединений могут получить доступ к определенному центру связывания Na^+ -канала, находящегося в плазматической мембране. Эта группа соединений включает алкалоиды подобно ВТХ, АС, ВЕР и GTX. Они связываются с участком связывания 2 у Na^+ -каналов. Все эти токсины существуют в природе: ВТХ секретируется кожей колумбийской ядовитой лягушки рода *Phylllobates*, а другие три токсина имеют растительное происхождение. ВЕР изолирован из алкалоидной смеси чемерицы - растения семейства *Liliaceae*. АС - алкалоид, вырабатываемый растением *Aconitum napellus*. GTX найден в рододендронах и других растениях семейства Вересковые (рис. 1-63 А).

Прежде всего, рассмотрим феноменологическую сторону нейротоксического действия ВТХ, VER, AC и GTX на мембраны клеток в виде первых наиболее простых экспериментов, выполненных с использованием этих соединений.

ВТХ можно рассматривать как полный агонист, так как при воздействии он вызывает одновременное изменение всех основных свойств Na^+ -каналов. Кроме двух выше упомянутых эффектов,

ВТХ ухудшает проводимость одиночных каналов и их селективность для ионов.

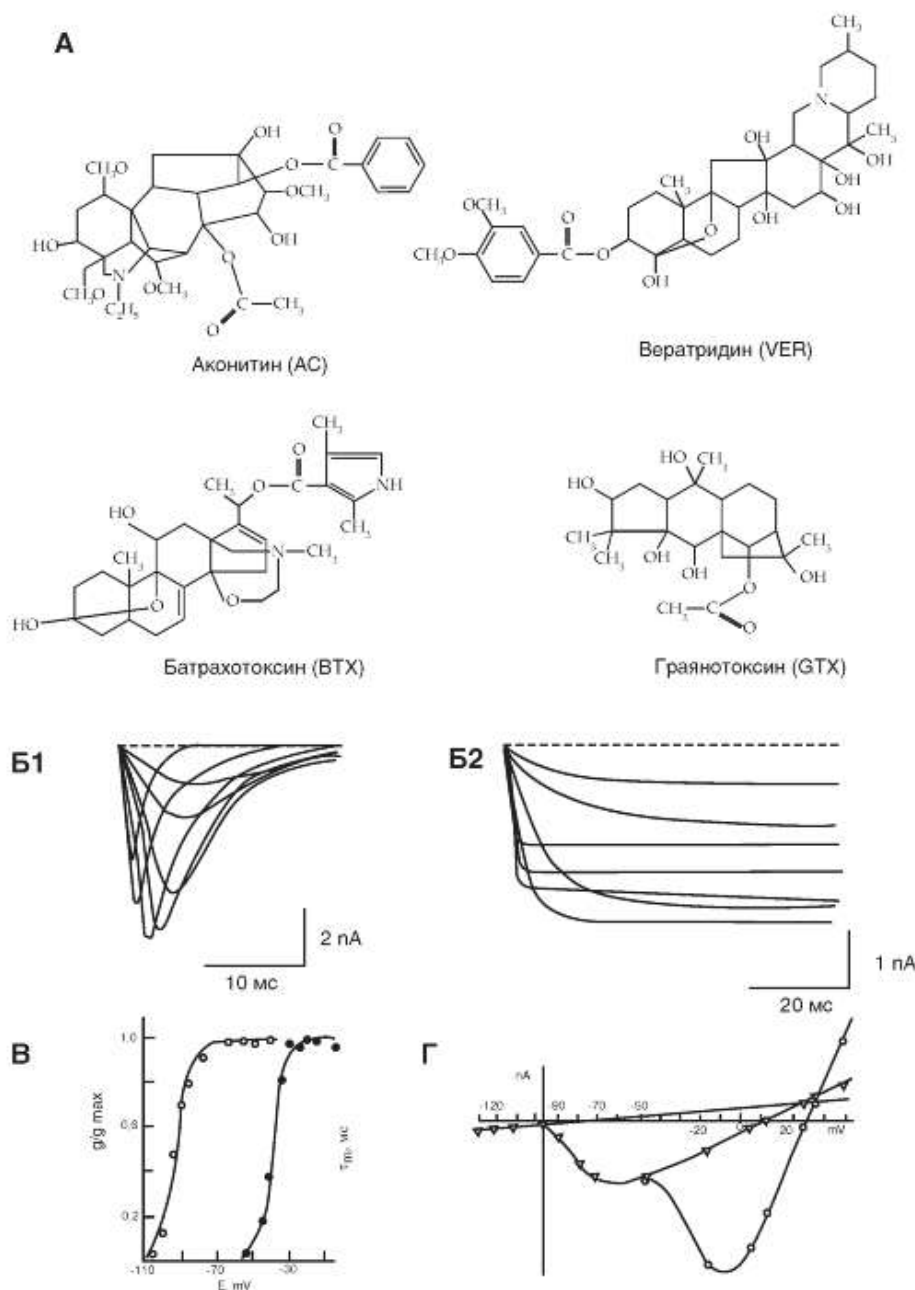
На рисунке 1-63 Б1 показано развитие во времени Na^+ -токов, текущих через Na^+ -каналы в клетках гибридной линии нейробластома-глиома, перфузируемых стандартным раствором, а затем (рис. 1-63 Б2) продемонстрированы Na^+ -токи, текущие через Na^+ -каналы в условиях перфузии клетки раствором, содержащим ВТХ в концентрации 5×10^{-6} М. Очевидно отсутствие фазы инактивации тока.

Далее показано (рис. 1-63 В) смещение влево примерно на 50 мВ активационной кривой под действием ВТХ в концентрации 5×10^{-6} М. Это смещение было меньше в клетках миокарда новорожденных крысят (приблизительно на 30 мВ).

На рисунке 1-63 Г представлены вольтамперные характеристики перехвата Ранвье, причем в первом случае перехват Ранвье находился в стандартном перфузионном растворе, а во втором случае - в растворе, содержащем ВТХ. Одна кривая построена по пиковым значениям интактного Na^+ -тока, а другая представляет собой вольтамперную кривую для модифицированных (треугольники) и интактных (кружочки) каналов.

Рис. 1-63. Блокаторы участка связывания 2 - батрахотоксин, вератридин, граянотоксин и аконитин, - эффект которых определяется постоянной активацией Na^+ -канала.

А - химическая структура токсинов, повышающих активацию натриевых каналов, - аконитина, вератридина, батрахотоксина и граянотоксина. Б - влияние батрахотоксина на Na^+ -токи у клеток нейробластомы. Б1 - Na^+ -токи, текущие через Na^+ -каналы в клетках нейробластомы, перфузируемых стандартным раствором. Поддерживаемый потенциал $E_{\text{hp}} = -100$ мВ. Тестируемые ступеньки деполяризации от E_{hp} до -45, -40, -35, -20, +15 мВ. Б2 - Na^+ -токи, текущие через Na^+ -каналы в клетках нейробластомы, перфузируемых стандартным раствором, содержащим батрахотоксин в концентрации 5×10^{-6} М через 30 мин после начала перфузии. Поддерживаемый потенциал $E_{\text{hp}} = -110$ мВ. Тестируемые ступеньки деполяризации от E_{hp} до -90, -85, -75, -65, -40, -35, -25 мВ. (Примечание: при экспериментах использовали гибридную линию нейробластома-глиомы NG 108-15.) В - влияние батрахотоксина в концентрации 5×10^{-6} М через 30 мин на активационную кривую у клеток нейробластомы. Черные кружочки - контроль, белые кружочки - влияние соединения. Г - вольтамперные характеристики, полученные для перехвата Ранвье, находящегося в стандартном перфузионном растворе (Г1). Вольтамперные характеристики, полученные для перехвата Ранвье, находящегося в стандартном перфузионном растворе, содержащем 2×10^{-5} М батрахотоксина (Г2). В обоих случаях кривые построены по пиковым (кружочки) и стационарным (треугольники) значениям мембранных токов. Изменение тока утечки демонстрирует прямая линия



Центр связывания 3 у Na^+ -канала

Участок связывания 3 взаимодействует с полипептидами α -токсина скорпиона и токсинов морских анемонов (АТХ), выделенных приблизительно 25 лет назад. Сначала они были известны как сердечные стимуляторы и нейротоксины. Механизм их действия - связывание с Na^+ -каналами возбудимых тканей и селективное ингибирование их инактивации, преимущественно за счет ингибирования переходов канала от открытого состояния в инактивированное состояние.

Фармакологические свойства токсинов морских анемонов (или актиний) хорошо изучены. Это полипептиды с молекулярной массой от 3 до 300 кДа, изолированные из щупальца морской анемоны. Токсины, изолированные из представителей родов *Anthopleura* (*anthopleurin*: Ap-A или Ap-B) и *Anemonia* (АТХ I, II или V), представлены относительно большими белками, классифицируемыми как токсины типа I морской анемоны. Для проявления их действия на Na^+ -каналы они должны быть апплицированы с внеклеточной стороны. Как было обсуждено выше, согласно

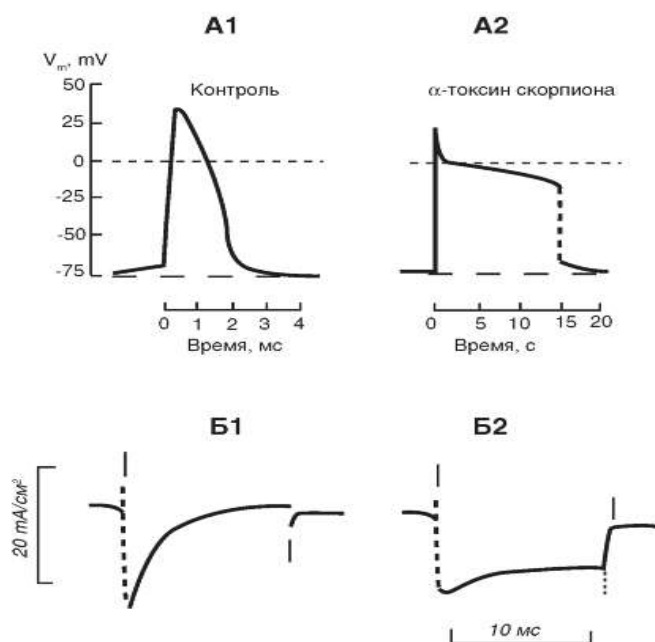
современным представлениям о структуре Na^+ -каналов домены, которые, как известно, связаны с инактивацией, в основном расположены внутриклеточно. Тот факт, что токсины морской анемоны модифицируют инактивацию, хотя они действуют с внеклеточной стороны, делает их перспективными для использования в качестве зондов при исследовании Na^+ -каналов.

На рисунке 1-64 А продемонстрирован потенциал действия перехвата Ранвье миелинизированного нерва лягушки в стандартном перфузионном растворе (рис. 1-64 А1) и после применения скорпиона (*Leiurus quinquestriatus*) в концентрации 1 мкг/мл (рис. 1-64 А2). Далее показан (рис. 1-64 Б) Na^+ -ток перехвата Ранвье до (Б1) и после (Б2) применения α -токсина скорпиона (*Leiurus quinquestriatus*). Наблюдается резкое замедление натриевой инактивации.

α -Токсины скорпиона вырабатываются североафриканскими скорпионами, относящимися к родам *Androctonus*, *Buthus* и *Leiurus*. α -Токсин V скорпиона, изолированный из яда *Leiurus quinquestriatus*, взаимодействует с нейротоксиновым рецепторным участком 3 у Na^+ -канала. Это связывание сильно зависит от потенциала и замедляет или блокирует инактивацию Na^+ -канала. α -Токсины скорпиона также аллостерически усиливают постоянную активацию теми нейротоксинами, которые связываются с участком 2, как, например, ВТХ. Структура нескольких токсинов из яда соответствующего скорпиона была определена методом рентгено-структурного анализа.

Рис. 1-64. Участок 3 связывает α -токсины скорпиона и токсины морских анемонов, которые замедляют или блокируют инактивацию. Соединения, связывающиеся на этом участке, также увеличивают постоянную активации Na^+ -каналов, вызванную токсинами, действующими на рецептор участка 2.

А - влияние яда скорпиона (*Leiurus quinquestriatus*) на потенциал действия перехвата Ранвье. А1 - потенциал действия перехвата Ранвье миелинизированного нерва лягушки в стандартном перфузионном растворе. А2 - потенциал действия через 5 мин после применения 1 мкг/мл токсина. Потенциал действия был вызван дополяризационным током длительностью 100 мкс. Б - Na^+ -ток перехвата Ранвье до (Б1) и после (Б2) применения α -токсина скорпиона (*Leiurus quinquestriatus*)



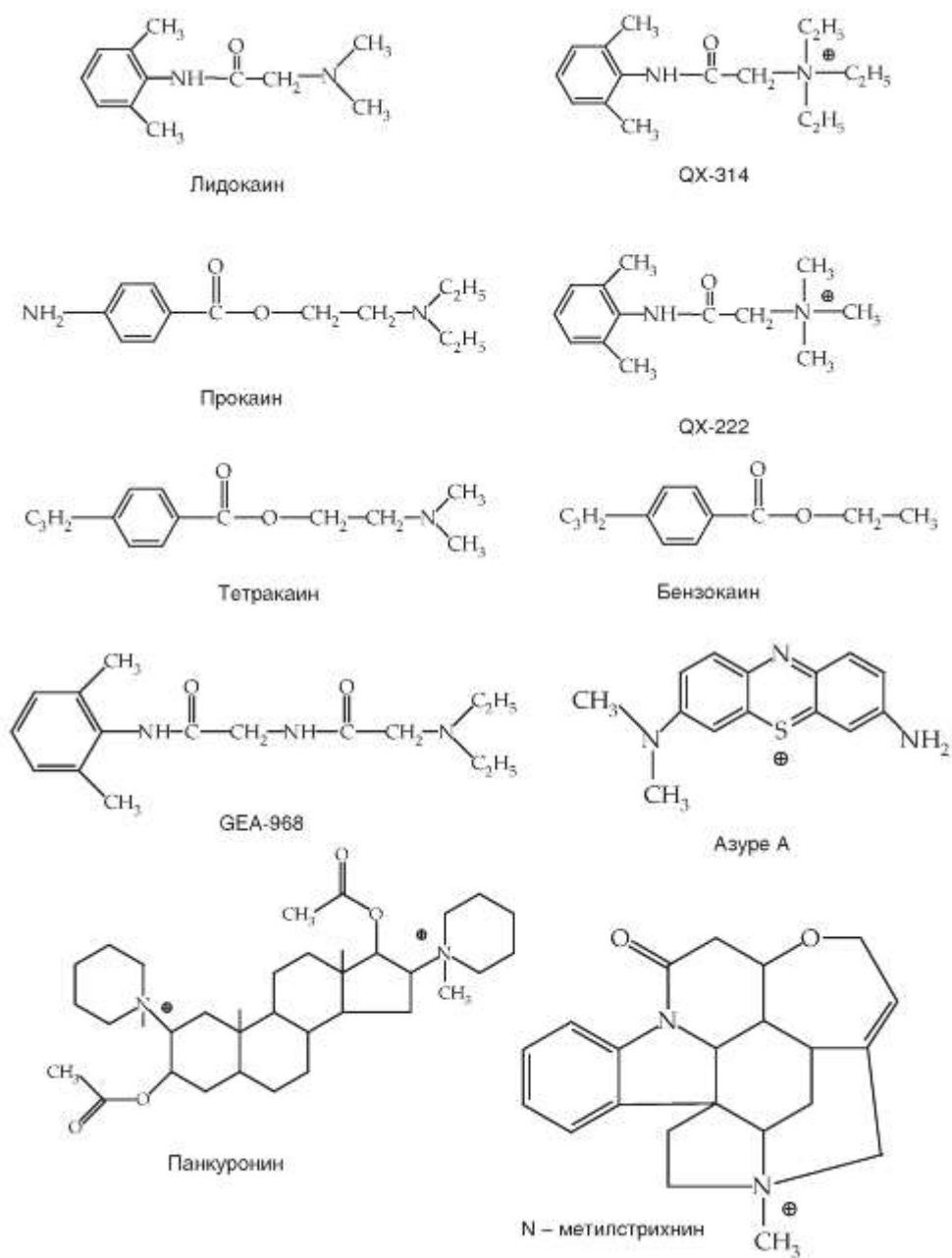
Центр связывания местных анестетиков у Na^+ -канала

Местные анестетики (рис. 1-65) типа лидокаина и прокаина вызывают эффект, блокируя Na^+ -каналы. Показано, что, кроме Na^+ -каналов, местные анестетики действуют на несколько типов ионных каналов из числа K^+ -каналов и Ca^{2+} -каналов, а также на рецепторы к нейротрансмиттерам. Все они представлены относительно небольшими липидорастворимыми молекулами, обычно содержащими аминогруппы, которые становятся положительно заряженными в кислой среде. Позднее информация относительно того, как работают местные анестетики, была получена на основании экспериментов с веществом QX-314, аналогом лидокаина, который всегда положительно заряжен и, следовательно, не растворим в липидах. Препарат QX-314В оказывает блокирующее действие на Na^+ -каналы клеток сердца при аппликации как с наружной, так и с внутренней стороны мембраны, но ингибирование Na^+ -каналов клеток мозга происходит только когда препарат апплицирован с внутриклеточной стороны. Различие в действии постоянно заряженных местных анестетиков, подобных QX-314, показано для Na^+ -каналов клеток сердца, мозга и для афферентных нейронов, расположенных в ганглиях задних корешков спинного мозга. Изучение широкого спектра разнообразных клеток *in vitro* с применением методов *patch-clamp* в конфигурации *whole-cell*, экспрессии α -субъединицы Na^+ -каналов в ооциты шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*) или клетки млекопитающих позволило обнаружить ингибирование Na^+ -каналов, когда они находятся в открытом состоянии (*use(-state)-dependent*). Действие местных анестетиков увеличивалось, когда поддерживаемые потенциалы устанавливали в области большей деполяризации, тогда как при поддерживаемых потенциалах, лежащих в области большей гиперполяризации, блокирующее действие уменьшалось.

Были многочисленны попытки охарактеризовать участок связывания местных анестетиков. В результате нескольких исследований было показано наличие дозозависимого эффекта при связывании VER и BTX и местных анестетиков, что предлагает аллостерическое взаимодействие этих двух участков связывания. Вне участка связывания 2 нет взаимодействия местных анестетиков с местами связывания нейротоксинов на других участках рецептора. Например, местный анестетик PD85,639 не конкурирует за связывание с антиконвульсионными препаратами фенитоином и карбамазепином, связывающихся в Na^+ -каналах из синапсом и синаптических мембран. Недавно опубликованные результаты показывают, что существует гидрофобный участок связывания, который отличается от участка связывания 2, но аллостерически с ним связанный. В нескольких исследованиях было показано предпочтительное взаимодействие соединений с Na^+ -каналом, находящимся в инактивированном состоянии. В противоположность этим результатам недавно были получены данные, что местный анестетик лидокаин не конкурирует с быстрой инактивацией. Результаты этих экспериментов свидетельствуют, что блокирующий эффект местных анестетиков не является результатом процесса медленного восстановления от быстрой инактивации и не вовлекает увеличение быстро инактивирующихся каналов, как это описано в других работах. Эти данные представляет новую модель, фокусирующуюся на процессах активации, как более уместных для механизма действия местных анестетиков.

Многие данные о мутациях поддерживают модель с отдельным участком связывания для QX-314. Подобные результаты получены и на скелетной мышце. Однако необходимо отметить, что направленные мутации аминокислот в других трех сегментах S6 в доменах DI-DIII, которые могут взаимодействовать с другими трансмембранными сегментами, до сих пор не были выполнены. Так как эти четыре домена канала, как полагают, должны располагаться вокруг поры канала, вероятно, что другие сегменты S6 могут также внести вклад в формирование рецептора для местных анестетиков. Аминокислотные остатки в петлях поры, которые формируют селективный фильтр, - также хорошие кандидаты для будущих экспериментов для определения мишени местного обезболивающего действия.

Рис. 1-65. Структура местных анестетиков, для которых обнаружен специфический участок связывания



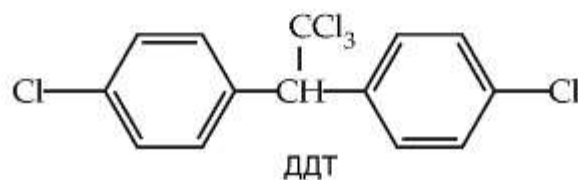
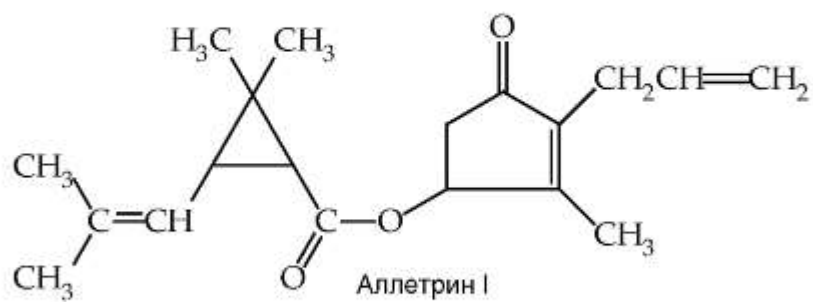
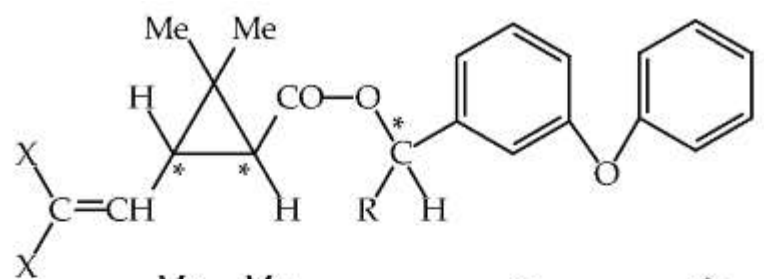


Рис. 1-66. Структура пиретроидов и 4,4-дихлордифенил-трихлорэтана, взаимодействующих с участком связывания 6

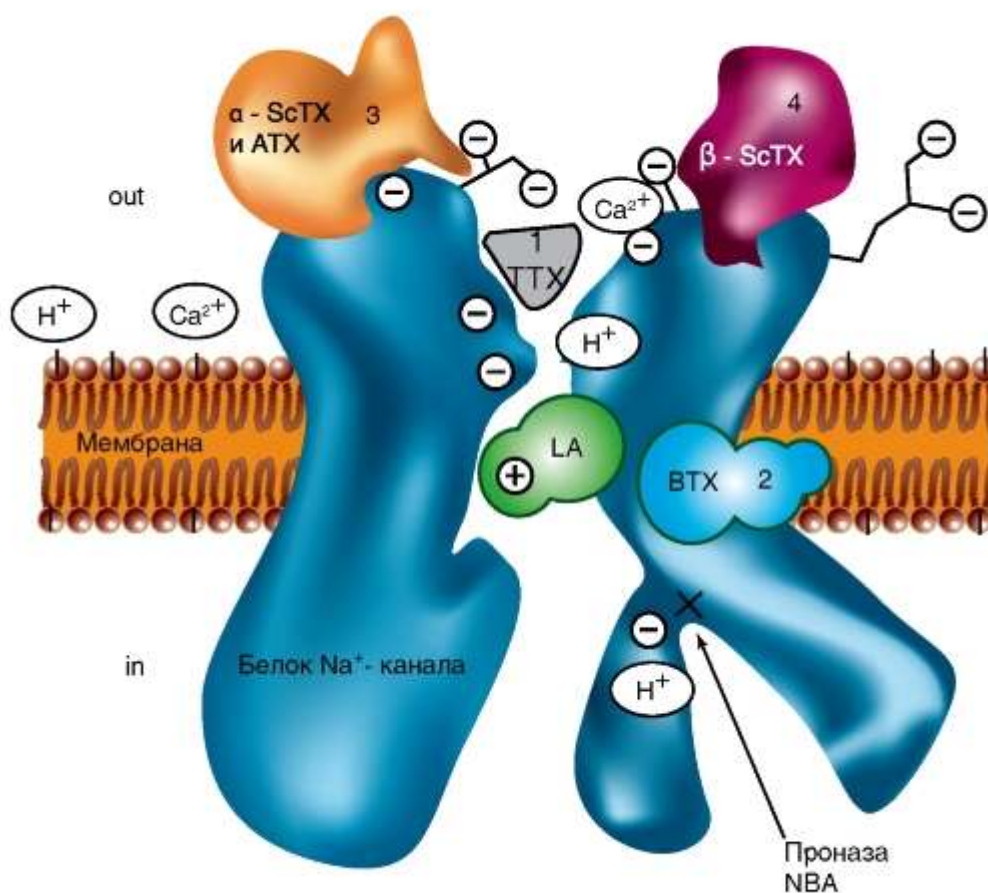


Рис. 1-67. Схема связывания токсинов с различными участками потенциал-управляемого Na^+ -канала

Ca^{2+} -ток и его характеристики

На рисунке 1-68 представлен типичный *wholecell* Ca^{2+} -ток ($I_{\text{Ca-L}}$), определяемый наличием Ca_v1 -каналов, зарегистрированный от изолированного вентрикулярного кардиомиоцита мыши. На панели А продемонстрирована оригинальная регистрация тока при ступенчатом смещении потенциала (-30, -10, 10, 30, 50 мВ) от поддерживаемого потенциала (*holding potential*: V_{hl}) = -50 мВ), а на панели Б представлена типичная вольтамперная характеристика, полученная на основе оригинальных регистраций от тех же клеток.

Корректное описание инактивации Ca^{2+} -токов представляет определенные сложности, поскольку этот процесс развивается во времени параллельно с развитием выходящих K^+ -токов. Именно поэтому регистрируемый спад Ca^{2+} -тока может быть не истинным, а определяться наложением на Ca^{2+} -ток одновременно развивающихся выходящих K^+ -токов. Для предотвращения подобных ошибок необходимо тщательно блокировать K^+ -токи. Их наличие в наиболее простой форме можно определить по амплитуде Ca^{2+} -тока в конце достаточно длинного по времени стимула. В этом случае она будет слегка превышать «нулевую» линию ($Y_0 > 0$). Следует отметить, что превышение «нулевой» линии в конце стимула может также отражать очень медленную (константа времени значительно больше длительности стимула) инактивацию исследуемого Ca^{2+} -тока,

поэтому, чтобы избежать возможных ошибок, сложный динамический процесс инактивации сводят к стационарной (*steady-state*) инактивации.

В этом случае измеряют уменьшение максимальной величины тока, вызванного тестирующими деполяризующими ступеньками, в случае, если перед этим мембранный потенциал определенное время (достаточно продолжительное по сравнению с длительностью инактивации) поддерживался на сниженном уровне. Зависимость этого уменьшения от величины поддерживаемого потенциала носит S-образную форму. При этом для характеристики Ca^{2+} -каналов помимо амплитуды кальциевого тока (I_{Ca}) обычно рассматриваются величина активации (V_a) и величина инактивации (V_h). Если сущность постоянных времени активации и инактивации Ca^{2+} -каналов достаточно понятна, то величины активации (V_a) и инактивации (V_h) требуют пояснения.

Принципы исследования активации и инактивации на примере $I_{\text{Ca,T}}$ тока показаны на панелях В, Г, Д, Е, Ж. На панели В представлены тестовые сигналы и *steady-state* активация $I_{\text{Ca,T}}$. Мембрана клетки была на поддерживаемом потенциале - 100 мВ в течение 1 с и Ca^{2+} -токи определяли при помощи деполяризующих шагов-ступенек. На панели Г показана активационная кривая, полученная на основании уравнения Больцмана в следующей форме:

$$I/I_{\text{max}} = 1/[1 + \exp(-(V-V_{0,5})/k)], \quad (1.30)$$

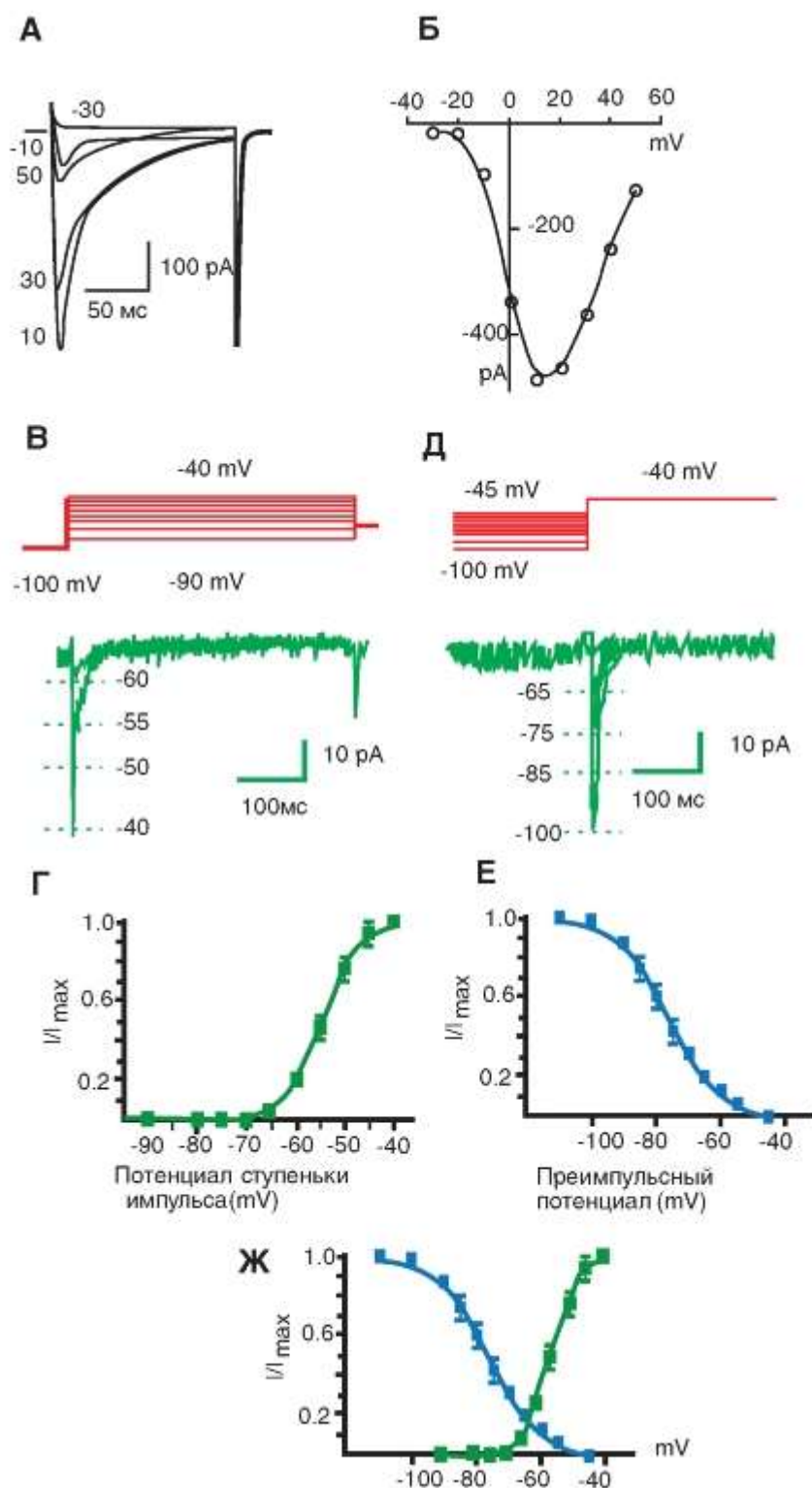
где I представляет собой амплитуду тока, I_{max} - максимальная амплитуда тока, V - тестовый потенциал, $V_{0,5}$ - потенциал полуактивации или иначе V_a . На панели Д представлены тестовые сигналы и *steady-state* инактивация $I_{\text{Ca,T}}$. Мембрана клетки была на поддерживаемом потенциале в диапазоне от -110 до -45 мВ в течение 1 с и Ca^{2+} -токи определяли при помощи деполяризующих шагов-ступенек до -40 мВ. На панели Е показана инактивационная кривая, полученная на основании уравнения Больцмана в следующей форме:

$$I/I_{\text{max}} = 1/[1 + \exp((V-V_{0,5})/k)], \quad (1.31)$$

где I представляет собой амплитуду тока, I_{max} - максимальная амплитуда тока, V - потенциал, $V_{0,5}$ - потенциал полуинактивации или иначе V_h . И в случае, представленном на панели Г, и в случае, продемонстрированном на панели Е константа k , представляет собой наклон кривой (фактор крутизны) и отражает *steady-state* потенциал-чувствительность каналов или «диапазон» потенциалов, в котором каналы функциональны. Чем больше k , тем уже диапазон. В части рисунка Ж кривые на панелях Г и Е объединены вместе.

Рис. 1-68. Типичный whole-cell Ca^{2+} -ток ($I_{\text{Ca-L}}$), зарегистрированный от изолированного кардиомиоцита желудочков мыши, мембрана которого имеет Ca_v1 -каналы.

А - оригинальная регистрация тока при ступенчатом смещении потенциала от поддерживаемого потенциала (*holding potential*) $V_h = -50$ мВ. Величина ступенек деполяризации относительно поддерживаемого потенциала представлена в виде цифр -30, -10, 10, 30, 50 мВ. Б - вольтамперная характеристика, полученная на основе оригинальных регистраций от тех же клеток. В-Ж - принципы регистрации и анализа активации и инактивации тока



Ca^{2+} -каналы L-типа и N-каналы

На рисунке 1-69 A1 показана оригинальная регистрация тока, текущего через одиночный канал подсемейства Cav1 (тока L-типа) на фоне ступеньки деполяризации, равной +10 мВ от поддерживаемого потенциала, равного -40 мВ. Далее показано (рис. 1-69 A2) распределение амплитуд тока при +10 мВ. Обычно предполагают, что амплитудная гистограмма хорошо описывается кривой Гаусса, если под пипеткой находится один канал и у него есть только одно открытое состояние, как это продемонстрировано на рис. 1-69 A1. Показана гауссовская кривая (см. рис. 1-69 A2), позволяющая оценить

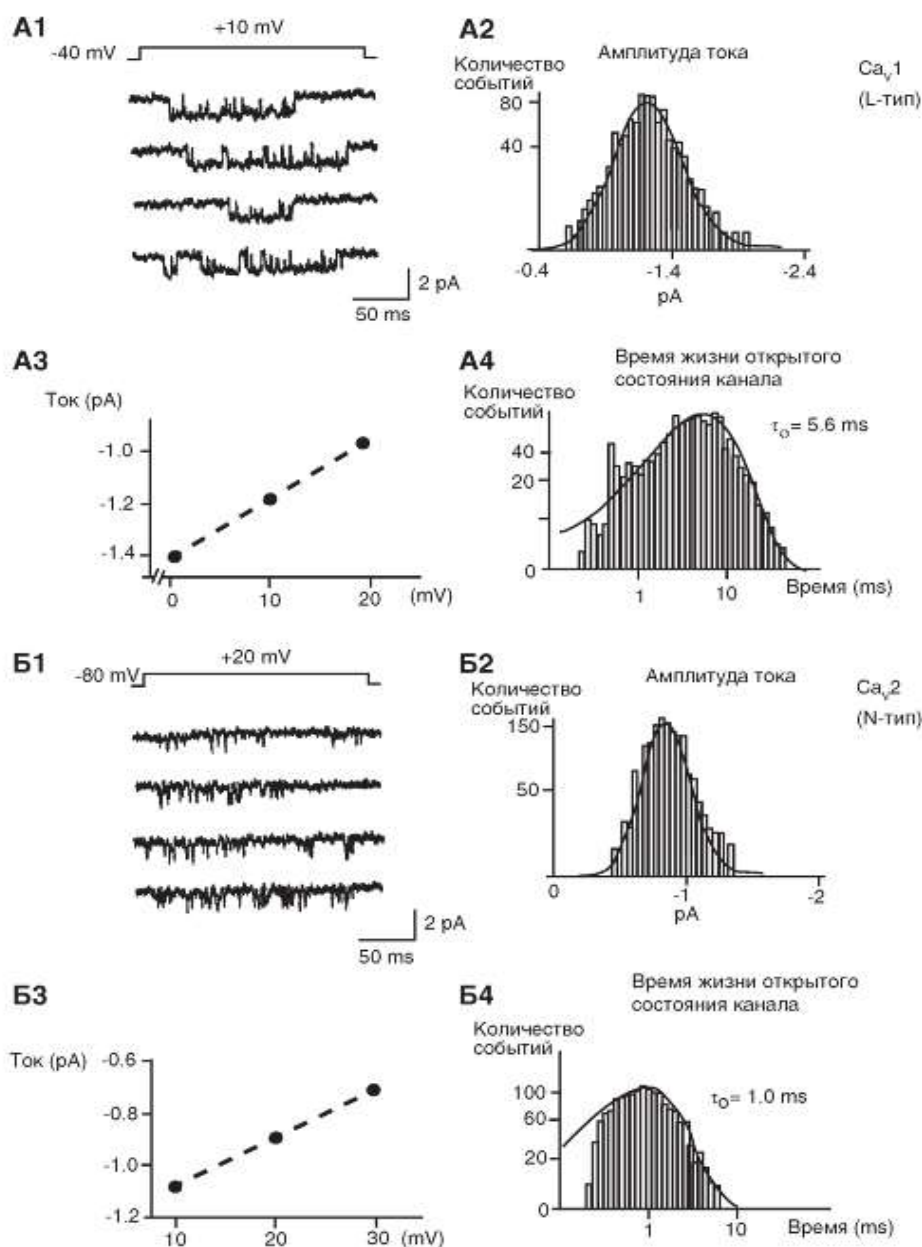
среднюю амплитуду тока (событий) и погрешность аппроксимации (стандартное отклонение), т.е. для данного случая это $-1,21 \pm 0,02$ пА при +20 мВ. По зависимости величин зарегистрированного тока от амплитуд ступенек деполяризации (рис. 1-69 А3) можно определить проводимость одиночного канала, т.е. наклон кривой (или иначе фактор крутизны). Амплитуда тока была $-1,41 \pm 0,03$ и $-0,97 \pm 0,02$ пА при 0 и +20 мВ соответственно, а проводимость одиночного канала в приведенном случае равна $22,0 \pm 1,1$ pS.

Наконец, дополнительную информацию о механизмах функционирования каналов можно получить из анализа гистограмм распределения времен жизни открытого или закрытого состояния канала (рис. 1-69 А4). Интерпретация последних обычно довольно сложная. Распределение времен жизни открытого состояния канала Ca_v1 при +10 мВ было аппроксимировано одной экспонентой с $\tau_0 = 5,60$ мс (см. рис. 1-69 А4). Среднее времен жизни открытого состояния канала, рассчитанное как среднее арифметическое всех данных, было равно $5,95 \pm 0,24$ мс.

Далее в качестве примера показаны (рис. 1-69 Б1) оригинальная регистрация тока одиночного канала Ca_v2 и распределение амплитуды тока при +20 мВ (рис. 1-69 Б2). Амплитуда тока была $-1,09 \pm 0,02$, $-0,89 \pm 0,02$ и $-0,73 \pm 0,02$ пА при +10, +20 и +30 мВ соответственно, а проводимость одиночного канала равна $18,0 \pm 1,1$ pS (рис. 1-69 Б3). Распределение времен жизни открытого состояния канала Ca_v2 при +20 мВ было аппроксимировано одной экспонентой с $\tau_0 = 1,04$ мс (рис. 1-69 Б4). Среднее времен жизни открытого состояния канала, рассчитанное как среднее арифметическое всех данных, было равно $1,14 \pm 0,02$ мс.

Рис. 1-69. Биофизические свойства Ca_v1 -канала и $Ca_v2.2$ -канала.

А - биофизические свойства Ca_v1 -канала с L-типом Ca^{2+} -тока, зарегистрированного в *cell-attached patch* у кортикальных астроцитов. А1 - регистрация тока одиночного канала подсемейства Ca_v1 (тока L-типа) на фоне ступени деполяризации, равной +10 мВ от поддерживаемого потенциала (*holding potential*) $V_{hp} = -40$ мВ. Раствор в patch-пипетке содержал 10 μ M СТх-MVHC и 5 μ M Bay K 8644. А2 - распределение амплитуд тока L-типа при +10 мВ. А3 - наклон кривой - проводимость одиночного канала, рассчитанная по величине зарегистрированного тока L-типа. А4 - гистограмма распределения времен жизни открытого состояния канала подсемейства Ca_v1 при +10 мВ. (Распределение времен жизни в открытом состоянии) (В пипетку добавлен активатор Bay K 8644 для всех Ca_v1 каналов, продуцирующих L-тока и СТх-MVHC). Б - биофизические свойства $Ca_v2.2$ -канала N-типа Ca^{2+} -каналов кортикальных астроцитов, зарегистрированных в *cell-attached patch*. Б1 - регистрация тока одиночного канала $Ca_v2.2$ -канала (тока N-типа) на фоне ступени деполяризации, равной +20 мВ от поддерживаемого потенциала (*holding potential*) $V_{hp} = -80$ мВ. Раствор в patch-пипетке содержал 5 μ M нифедипина и 100 нМ SNX-482. Б2 - распределение амплитуд тока N-типа при +20 мВ. Б3 - наклон кривой - проводимость одиночного канала, рассчитанная по величине зарегистрированного тока N-типа. Б4 - гистограмма распределения времен жизни открытого состояния канала $Ca_v2.2$ при +20 мВ. (Распределение времен жизни в открытом состоянии.)



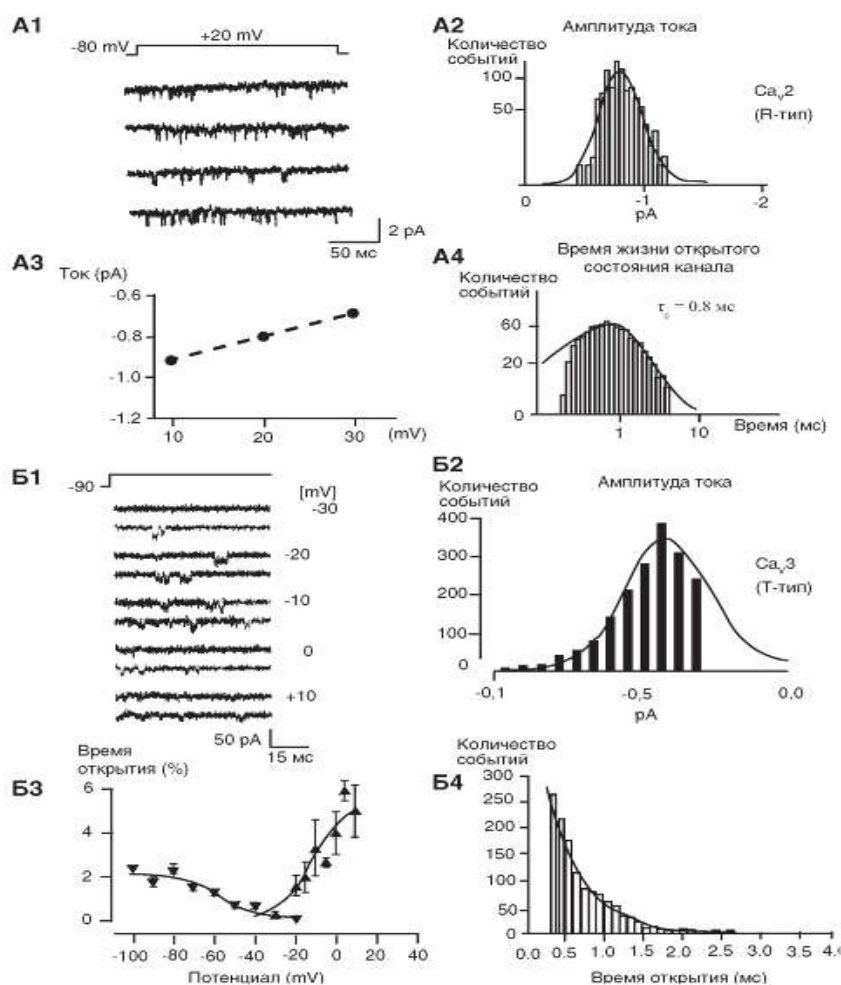
Ca²⁺-каналы R-типа и T-типа

На рисунке 1-70 A1 в качестве примера показана оригинальная регистрация тока одиночного канала Ca_v2.3 и распределение амплитуды тока при +20 мВ со средней величиной $-0,81 \pm 0,01$ пА (рис. 1-70 A2). Амплитуда тока была $-0,92 \pm 0,01$ и $-0,71 \pm 0,01$ пА при +10 и +30 мВ соответственно, а проводимость одиночного канала равна $10,5 \pm 0,3$ пС (рис. 1-70 A3). Распределение времен жизни открытого состояния канала Ca_v2.3 при +10 мВ было аппроксимировано одной экспонентой с $\tau_0 = 0,80$ мс (рис. 1-70 A4). Среднее времен жизни открытого состояния канала, рассчитанное как среднее арифметическое всех данных, было равно $0,88 \pm 0,02$ мс.

На рисунке 1-70 B1 в качестве примера показаны оригинальная регистрация тока одиночного канала Ca_v3.2, зарегистрированного в *cell-attached patch*, распределение амплитуд тока (рис. 1-70 B2), активация (правая кривая) и инактивация (левая кривая) тока (рис. 1-70 B3), гистограмма распределения времен жизни открытого состояния канала (рис. 1-70 B4).

Рис. 1-70. Биофизические свойства Ca_v2.3-канала и Ca_v3.2-канала.

А - биофизические свойства $\text{Ca}_v2.3$ -канала с R-типом Ca^{2+} -тока, зарегистрированного в *cell-attached patch* у кортикальных астроцитов. А1 - регистрация тока одиночного канала $\text{Ca}_v2.3$ (тока R-типа) на фоне ступени деполяризации, равной +20 мВ от поддерживаемого потенциала (*holding potential*) $V_{\text{hp}} = -80$ мВ. Раствор в patch-пипетке содержал 5 μM нифедипина и 10 μM CTx-MVHC. До регистрации клетки находились в течение 10 мин в растворе Тироде, содержащем 3 μM CTx-GVIA и 10 μM CTx-MVHC. А2 - распределение амплитуд тока R-типа при +20 мВ. А3 - наклон кривой - проводимость одиночного канала, рассчитанная по величине зарегистрированного тока R-типа. А4 - гистограмма распределения времен жизни открытого состояния канала $\text{Ca}_v2.3$ при +10 мВ. (Распределение времени жизни в открытом состоянии.) Б - биофизические свойства канала подсемейства Ca_v3 на примере канала $\text{Ca}_v3.2$ с Т-типом Ca^{2+} -тока, зарегистрированного в *cell-attached patch* у НЕК 293 клеток. Б1 - регистрация тока одиночного канала $\text{Ca}_v3.2$ (тока Т-типа) на фоне ступенек деполяризации, величина которых в цифровом виде представлена на картинке, от поддерживаемого потенциала (*holding potential*) $V_{\text{hp}} = -90$ мВ. Б2 - распределение амплитуд тока Т-типа со средней величиной $-0,41 \pm 0,01$ пА. Б3 - исследования активации (правая кривая) и инактивации (левая кривая) тока через канал $\text{Ca}_v3.2$. Каждые 2 с от поддерживаемого потенциала величиной -90 мВ подавали деполяризационные ступеньки (для исследования процесса активации канала) или от различных величин поддерживаемого потенциала подавали ступеньку до -10 мВ (для исследования процессов инактивации канала). Б3 - гистограмма распределения времен жизни открытого состояния канала $\text{Ca}_v3.2$ при -10 мВ. (Распределение времени жизни в открытом состоянии.) Распределение времен жизни открытого состояния канала $\text{Ca}_v3.2$ при тестовом потенциале -10 мВ было аппроксимировано одной экспонентой с $\tau_0 = 0,48$ мс



Блокаторы и активаторы Ca^{2+} -каналов

Фармакология трех семейств кальциевых каналов хорошо изучена. Каналы Ca_v1 служат молекулярной мишенью для органических блокаторов Ca^{2+} -каналов, широко применяемых в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Как полагают, эти вещества действуют на три отдельных, но аллостерически связанных, рецепторных участка.

Фенилалкиламины представляют собой блокаторы внутриклеточного участка поры. Полагают, что эти вещества входят в пору из цитоплазматических участков канала и осуществляют блокаду. Их рецепторные участки образованы аминокислотными остатками в S6-сегментах в домене III и IV по аналогии с рецепторным участком для анестетиков у Na^+ -каналов.

Дигидропиридины могут быть активаторами или ингибиторами Ca^{2+} -каналов и полагают, что они действуют аллостерически, сдвигая моду функционирования канала в направлении открытого или закрытого состояния, скорее, чем закупоривая пору. Их рецепторный участок включает аминокислотные остатки в S6-сегментах в домене III и IV и S5-сегменте домена III. Места связывания дигидропиридинов и фенилалкиламов связаны и частично перекрываются.

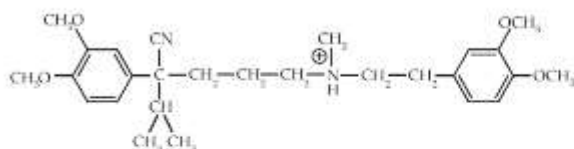
Бензодиазепины, представляющие собой группу синтетических веществ (один из которых дилтиазем), связываются с рецепторным участком, который перекрывается с местом связывания фенилалкиламинов.

Семья Ca_v2 Ca^{2+} -каналов относительно нечувствительна к дигидропиридиновым блокаторам Ca^{2+} -каналов, но эти Ca^{2+} -каналы специфически блокируются пептидными токсинами пауков и морских улиток. $\text{Ca}_v2.1$ -каналы блокируются специфически ω -агатоксин IVA яда из паутины паука. $\text{Ca}_v2.2$ -каналы блокируются специфически ω -конотоксином GVIA и сопоставимы с токсинами улиток. $\text{Ca}_v2.3$ -каналы блокируются специфически пептидным токсином SNX-482, выделенным из яда тарантулов. Эти пептидные токсины могут быть потенциальными блокаторами синаптической передачи, потому что их специфические эффекты реализуются через Ca_v2 семью Ca^{2+} -каналов.

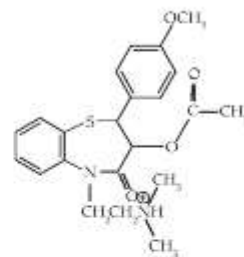
Семья Ca_v3 Ca^{2+} -каналов нечувствительна к обоим дигидропиридинам, блокирующим Ca_v1 -каналы, и токсину паука или токсину конусной улитки, блокирующим Ca_v2 . Специфические блокаторы Ca_v3 -каналов пока не найдены. Органический блокатор Ca^{2+} -каналов мибефрадил в какой то степени специфичен для Ca_v3 по сравнению с Ca_v1 Ca^{2+} -токов (в три-пять раз). Пептид куртоксин ингибирует активационные ворота $\text{Ca}_v3.1$ - и $\text{Ca}_v3.2$ -каналов. Развитие более специфических и высокоафинных блокаторов Ca_v3 семьи Ca^{2+} -каналов должно быть полезным для более детального анализа физиологической роли этих каналов.

Рис. 1-71. Фармакологические соединения, мишенью которых служат Ca^{2+} -каналы

Фенилалкиламины

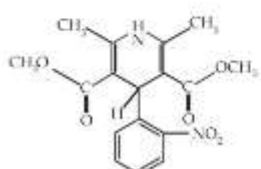


Верапамил

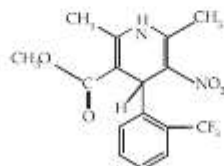


Дилтиазем

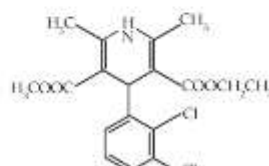
Дигидропиридины



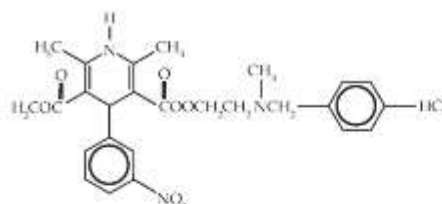
Нифедипин
Са антагонист ингибитор



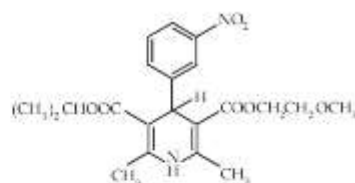
ВАЗ К 8644
Са агонист активатор



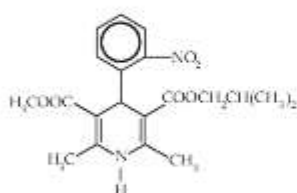
Фелодипин



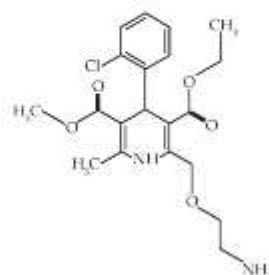
Никадипин



Нимодипин



Низолдипин



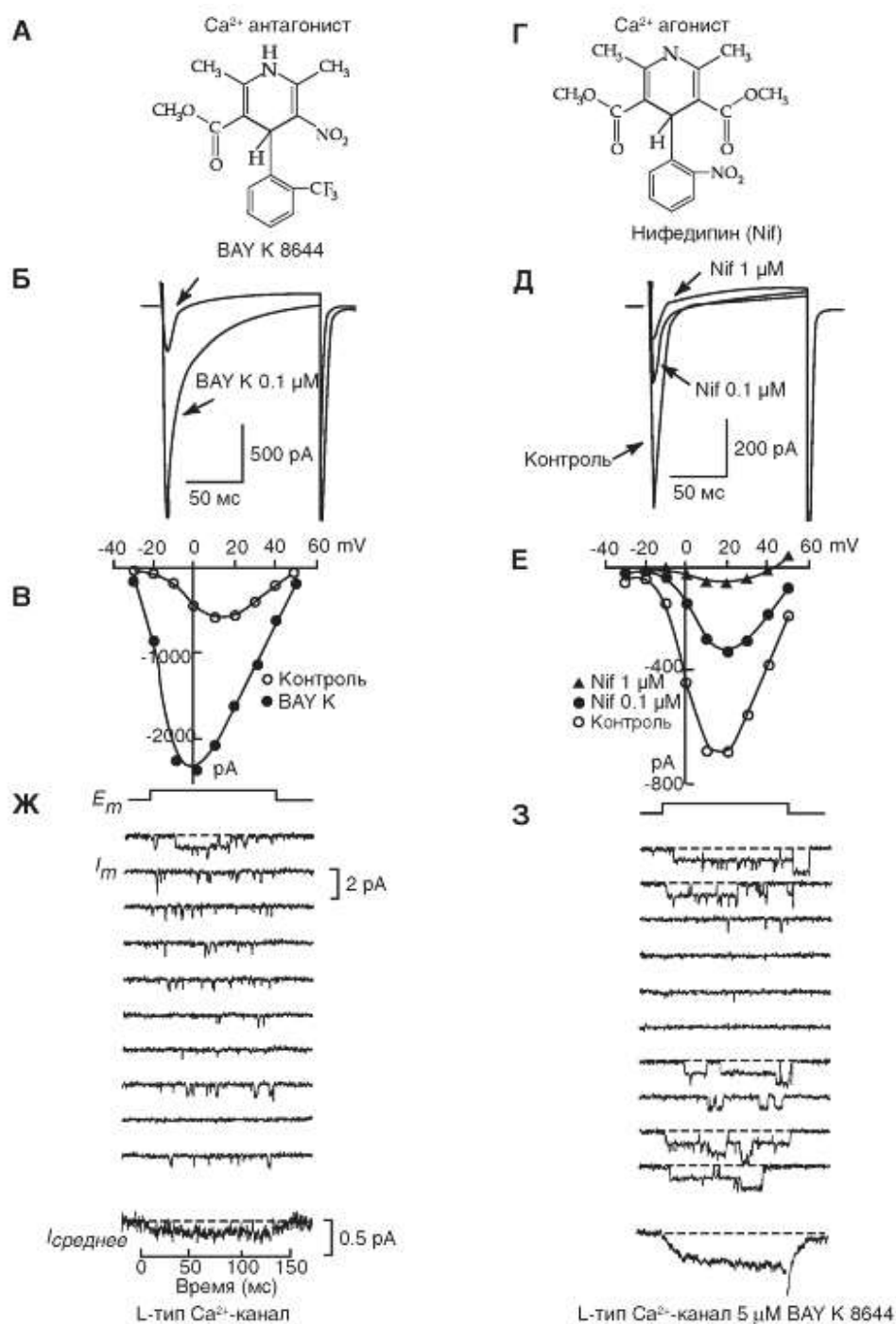
Амлодипин

Изменение Ca^{2+} -токов под действием Ca^{2+} агонистов и антагонистов

На рисунке 1-72 продемонстрированы примеры действия фармакологических препаратов на типичный *whole-cell* Ca^{2+} -ток ($I_{\text{Ca,L}}$), определяемый наличием Ca_v1 -каналов, зарегистрированный от изолированного вентрикулярного кардиомиоцита мыши. На панели Б представлены контрольная регистрация тока и регистрация после добавления 0,1 μM ВАЗ К8644, а на панели В показаны две вольтамперные характеристики клетки: одна получена в стандартном перфузионном растворе, а другая в том же растворе, но содержащем 0,1 μM ВАЗ К8644. На панели Д показаны оригинальные кривые Ca^{2+} -тока при отсутствии и присутствии 0,1 μM и 1 μM нифедипина, а на панели Е показаны три вольтамперные характеристики клетки: одна получена в стандартном перфузионном растворе, другая в том же растворе, но содержащем 0,1 μM нифедипина, а третья - 1 μM нифедипина.

Панель Ж демонстрирует регистрацию одиночного Ca^{2+} -канала L-типа в контрольных условиях, а панель З показывает характер изменений того же канала при добавлении 5 μM ВАЗ К8644.

Рис. 1-72. Примеры действия фармакологических препаратов на типичный *whole-cell* Ca^{2+} -ток ($I_{\text{Ca,L}}$), зарегистрированный от изолированного кардиомиоцита желудочков мыши, мембрана которого имеет Ca_v1 -каналы. На панелях А и Г представлена структура действующих соединений BAY K 8644 (А) и нифедипина (Г). На панелях Б и Д показаны оригинальные кривые Ca^{2+} -тока при отсутствии и присутствии этих соединений. Показано изменение Ca^{2+} -тока после добавления 0,1 μM BAY K 8644 (Б) или 0,1 и 1 μM нифедипина (Д). Деполаризующие импульсы до 0 мВ (Б) или до +20 мВ (Д) были поданы от поддерживаемого потенциала (*holding potential*) $V_{\text{hp}} = -50$ мВ. На панелях В и Е показаны соответствующие рисункам Б и Д вольтамперные характеристики вентрикулярных миоцитов мыши при отсутствии и присутствии тестируемых соединений. Наконец, на панели Ж показан пример регистрации L-типа Ca^{2+} -канала в контроле, а на панели З при добавлении 5 μM BAY K 8644



Модель Ca^{2+} -поры

Модели двухмерной топографической карты поры с использованием предполагаемых «холмов» и «ям» химической потенциальной энергии, преодолеваемых ионом при прохождении через канал, объясняли проницаемость канала с позиций теории скоростей реакции. Первоначально с помощью них пытались объяснить проницаемость ионов. «Ямы» - места связывания; «холмы» - энергетические барьеры, препятствующие движению иона между местами связывания или его выходу из поры. На рисунке 1-73 показана модель, созданная на основе «теории скоростей реакции» для объяснения проницаемости Ca^{2+} -канала. Каждая модель начинается с Ca^{2+} -связывающего участка, имеющего константу диссоциации, величина которой измеряется в микромолях. Это соответствует «потенциальной яме» с энергией приблизительно 14 кТ ($\Delta G = kT \cdot \ln K_D$, где k - константа Больцмана и T - температура). Стрелка 1 на каждом рисунке обозначает энергетическую разницу, определяющую высокую афинность места связывания. Барьеры на внешней стороне поры должны быть достаточно высоки, чтобы ионы не входили быстрее реальной скорости диффузии. Это требует приблизительно 8 кТ. Стрелка 2 показывает значение энергии, определяющей ограничивающую скорость (*rate limiting step*), т.е. наибольший энергетический барьер, препятствующий выходу иона из каждой модели поры.

Если бы был только один такой участок в поре (рис. 1-73 А1), то ион, проходящий эту пору, должен был бы преодолеть энергетический барьер в 22 кТ, что соответствует скорости потока ионов через Ca^{2+} -каналы меньше чем 2000 ионов в секунду, т.е. приблизительно в 1000 раз меньше, чем величины регистрируемых пикоамперных токов. Это показывает, что селективность не может быть обеспечена тем, что пора становится «липкой» для специфического иона, потому что в этом случае ион перемещается через пору слишком медленно.

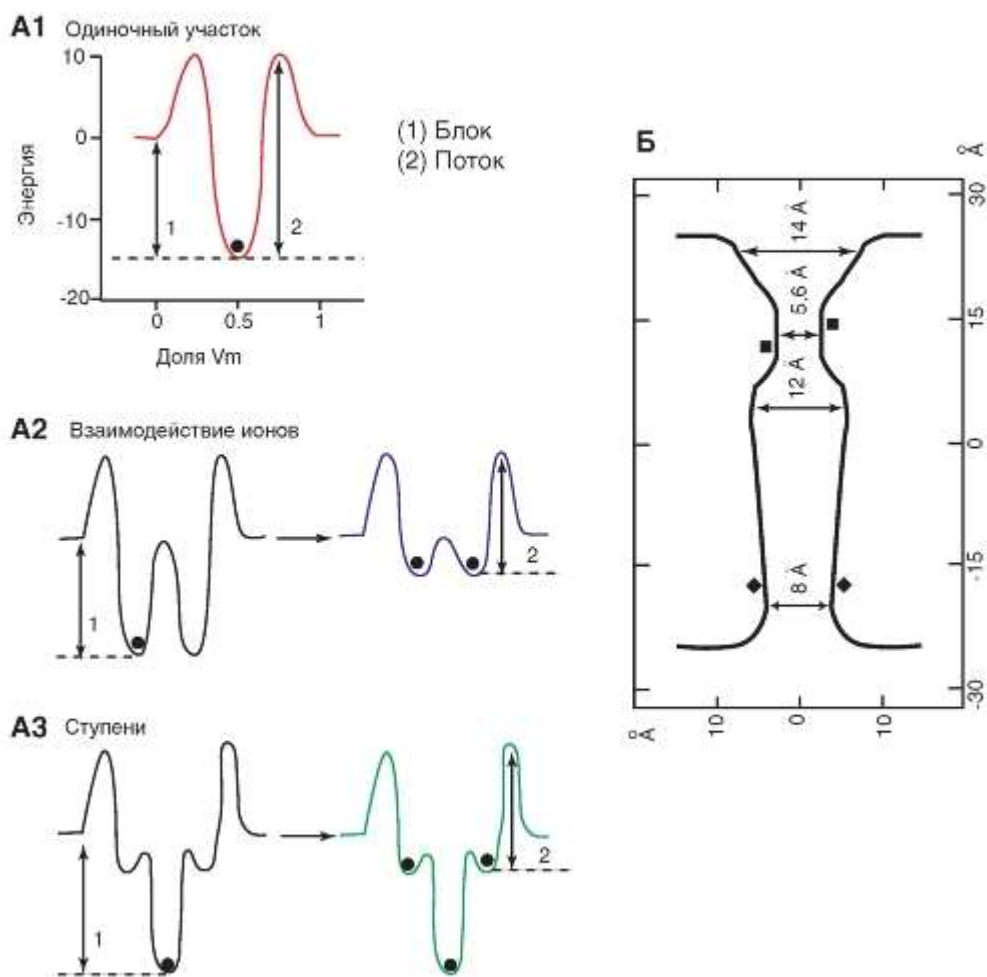
Теория скоростей реакции предлагает два независимых пути для обеспечения высокого потока ионов через «липкую» пору, но оба требуют, чтобы пора могла удерживать больше одного иона Ca^{2+} одновременно. На рисунке 1-73 А2 продемонстрирован механизм, используемый двумя идентичными участками высокоафинного связывания. Один ион Ca^{2+} перебрасывается назад и вперед между ними с небольшим шансом для выхода. Поскольку в такой модели ионы не могут ни перепрыгнуть друг друга, ни войти в занятый участок связывания, один ион Ca^{2+} преграждает вход ионам другого сорта. Но можно предположить, что, когда два иона Ca^{2+} находятся в поре, они взаимодействуют, чтобы уменьшить афинность мест связывания для Ca^{2+} . Эти более мелкие «колодцы» (стрелка 2) допускают больший поток ионов. Однако в поре обнаружен так называемый ЕЕЕЕ-локус, и только он может быть высокоафинным участком связывания, что противоречит представлениям о двух идентичных связывающих участках. Наличие ЕЕЕЕ- локуса опровергает детали модели, представленной на данном рисунке, но не ее основной принцип. Предполагается, что существуют еще два боковых низкоафинных участка с каждой стороны. Это привело к созданию модели, представленной далее (рис. 1-73 А3), на которой мелкие «колодцы» тесно примыкают с каждой стороны к одному глубокому «колодцу». В такой модели у ионов нет возможности взаимодействовать, поэтому при мультиионной оккупации поры энергетические колодцы и барьеры не изменяются. Но простое присутствие низкоафинных примыкающих участков означает, что ограничивающий скорость барьер для выхода (стрелка 2) имеет примерно такие же размеры, как в модели, где ионы имеют возможность взаимодействовать. Серия участков с уменьшающейся афинностью ускоряет поток ионов через химические потенциальные энергетические барьеры.

Пора имеет форму песочных часов (рис. 1-73 Б). Диаметр селективного фильтра равен 5,6 А, т.е. почти в 3 раза шире, чем диаметр иона Ca^{2+} , поэтому селективность нельзя объяснить тесным совпадением диаметра иона и диаметра отверстия, что лежит в основе

механизма селективности K^+ -каналов. Важно положение зарядов (квадратики) четырех глутаматов EEEE-локуса.

Рис. 1-73. Модели Ca^{2+} -канала, объясняющие его проницаемость и структуру поры.

А - теория скоростей реакции описывает поры, которые тесно связывают ионы Ca^{2+} . Горизонтальная ось: фракция электрического поля через пору. Вертикальная ось: энергия химического потенциала для Ca^{2+} , когда он проходит через пору. Стрелка 1 соответствует энергии, которая определяет Ca^{2+} -блок для ионов другого сорта. Стрелка 2 указывает самый высокий прыжок энергии в каждой модели, который ограничивает скорость выхода иона Ca^{2+} из поры. Поток очень низок в поре с одним участком, потому что существует высокоэнергетический барьер для выхода (1); мультиионные поры представляют два различных механизма для уменьшения энергетического барьера, лимитирующего скорость потока; (2) взаимодействия иона с ионом (*ion interaction*) и (3) лестница шагов - «ступени» потенциальной энергии (*stairs*), - созданная низкоафинными участками связывания, и примыкающий селективный участок. Б - поперечный разрез поры. Показаны узкий и короткий селективный фильтр около внешней стороны и широкая область в центре мембраны



K^+ -токи и каналы

Калиевые каналы представляют собой наиболее обширное семейство ионных каналов (K^+ -каналов), генерирующих разнообразные калиевые токи (K^+ -токи). Эти токи можно регистрировать как от целой клетки методом *patch-clamp* в конфигурации *wholecell* (тогда жаргонно эти токи называют макроскопическими) или от одиночного канала, также

методом *patch-clamp*, но в других конфигурациях (тогда их нередко называют микроскопическими токами). K^+ -токи можно зарегистрировать от клеток, у которых есть преимущественно K^+ -каналы (рис. 1-74 А). Обычно это экспрессированные в билипидные слои каналы. Можно и на любой клетке заблокировать работу всех каналов, кроме K^+ -каналов (рис. 1-74 Б). На этих двух рисунках представлены оригинальные кривые *whole-cell* K^+ -тока, созданного работой потенциалуправляемых K^+ -каналов при различных значениях смещаемого потенциала относительно поддерживаемого потенциала.

Обсудим некоторые данные, характеризующие работу абстрактных K^+ -каналов. На рисунке 1-74 В представлена вольтамперная кривая K^+ -каналов, рассчитанная при помощи уравнения Гольдмана-Ходжкина-Катца. Сплошная кривая отражает K^+ -ток, предсказанный на основании уравнения с допущением, что мембрана хорошо проницаема для ионов K^+ , причем $[K^+]_{in}$ равна 155 мМ, а $[K^+]_{out}$ равна 4,5 мМ. Величина -95 мВ - потенциал реверсии (reversal potential: V_{rev}), потому что при этом потенциале направление тока меняет значение, а в самой точке, равной -95 мВ, ток равен нулю. В физике направление тока всегда такое же, как и направление перемещения положительных зарядов. Ток ионов, текущий в клетку, будет, таким образом, называться *inward current*, а ток ионов, текущий из клетки, - всегда *outward*. Пунктирная линия демонстрирует ток, который можно ожидать, если $[K^+]_{in}$ равна $[K^+]_{out}$ и соответствует 155 мМ.

Наконец на рис. 1-74 Г показана регистрация одиночного канала K^+ -канала.

Традиционно K^+ -токи и соответственно K^+ -каналы вследствие их функции были описаны и классифицированы главным образом в возбудимых клетках. Они включали классические:

- K^+ -каналы задержанного выпрямления (*delayed outward rectifier K^+ -channels (currents)* - I_K);
- быстрые транзиторные K^+ -каналы выходящего тока (*fast transient K^+ -channels (currents)* - I_A , или *transient outward current* - I_{to});
- K^+ -каналы аномального выпрямления с током входящего направления (*inward rectifier K^+ - channels* - I_{K1});
- Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы (*Ca^{2+} dependent K^+ -channels* - K_{Ca});
- каналы, через которые проходит ток утечки (*leak currents*), определяемый преимущественно ионами K^+ .

Чуть больше десятилетия назад была принята первая стандартная номенклатура для генов шести трансмембранных сегментов потенциалуправляемых K^+ каналов, названных K_V -системой. В нее прежде всего вошли:

- K^+ -каналы задержанного выпрямления (*delayed outward rectifier K^+ -channels* - I_K);
- быстрые транзиторные K^+ -каналы выходящего тока (*fast transient K^+ -channels (currents)* - I_A , или *transient outward current* - I_{to}).

Эта номенклатура была основана на выведенных филогенетических связях. Каналы, в составе которых обнаружено более 65% идентичных аминокислотных остатков, были объединены в одно подсемейство. В отдельную группу были выделены K^+ -каналы аномального выпрямления с током входящего направления (*inward rectifier K^+ - channels*), которая была названа K_{ir} .

Таким образом, принятая в настоящее время классификация делит K^+ -каналы на:

- потенциалуправляемые K^+ -каналы (K_V), которые включают:
- K^+ -каналы задержанного выпрямления (*delayed outward rectifier K^+ -channels* - I_K);

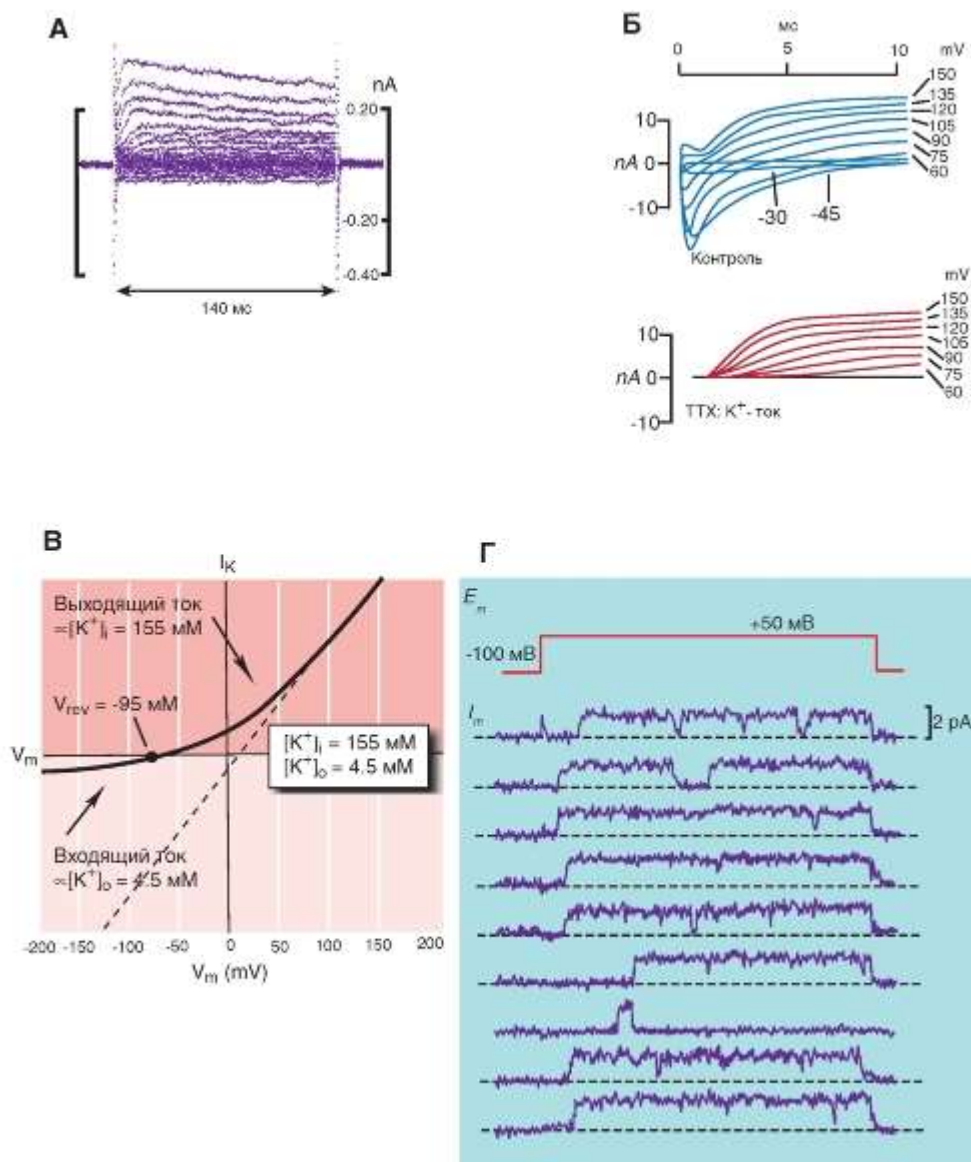
- быстрые транзиторные K^+ -каналы выходящего тока (*fast transient K^+ -channels (currents)* - I_A , или *transient outward current* - I_{to});

• K^+ -каналы аномального выпрямления с током входящего направления (*inward rectifier K^+ -channels* - K_{ir});

• Ca^{2+} -активируемые K^+ -каналы (K_{Ca});

• K^+ -каналы с двумя петлями в домене (*two-P K^+ -channels* - K_{2P}).

Рис. 1-74. Примеры оригинальной регистрации *whole-cell* K^+ -тока, вольтамперной характеристики *whole-cell* K^+ -тока и активности одиночного канала



Характеристики K^+ -токов

Разлагая на компоненты ионные токи можно вычлени́ть входящий Na^+ -ток и выходящий K^+ -ток, представив их отдельно. Анализ этих «макроскопических токов», т.е. токов, зарегистрированных методом *voltage-clamp* или *patch-clamp* в конфигурации *whole-cell*, обсуждался ранее. Этот анализ позволяет разделить K^+ -токи на потенциалуправляемые (включающие K^+ -токи задержанного выпрямления и быстрые

транзиторные K^+ -токи выходящего направления), K^+ -токи аномального выпрямления входящего направления, Ca^{2+} -активируемые K^+ -токи и токи утечки. Но детальную информацию дал анализ одиночных K^+ -каналов методом *patch-clamp*. Микроскопические механизмы, то есть механизмы на уровне токов, текущих через одиночные каналы, лежащие в основе макроскопических вольт-амперных характеристик, то есть процессов, происходящих на уровне токов, текущих через целую клетку.

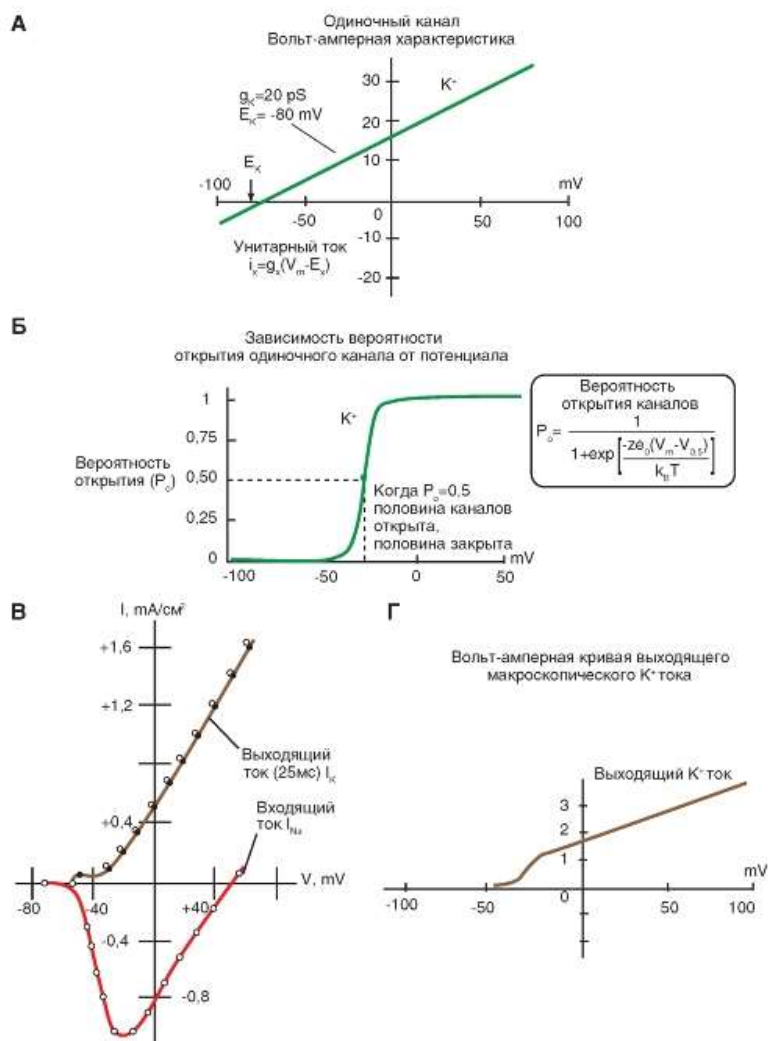
На рис. 1-75 А линия обозначает вольт-амперную зависимость идеализированного открытого калиевого канала. Т.к. мы исходим из начальной предпосылки, что канал в нашем случае будет полностью открыт все время (т.е. что проводимость каналов не будет функцией напряжения) тогда ток, текущий через них, будет линейным или «омическим».

На рис. 1-75 Б представлена кривая, которая показывает вероятность того, что калиевый канал будет находиться в открытом состоянии (вероятность открытия калиевого канала). Уравнение, приведенное во вставке в рисунок, описывает приведенную кривую, если мы вставим значения $zK = 5,3$ и $V_{0.5} = -30$ mV.

На рис. 1-75 В представлен отдельно макроскопический калиевый ток.

На рис. 1-75 Г представлена оценка макроскопического калиевого тока посредством умножения одноканальных токов из секции А рисунка на вероятность их открытия P_o из секции Б и на количество каналов (N). В данном случае мы устанавливаем количества каналов в 100 калиевых.

Рис. 1-75. Общая характеристика потенциалуправляемых K^+ -каналов и K^+ -токов. Описание в тексте



K⁺-каналы задержанного выпрямления

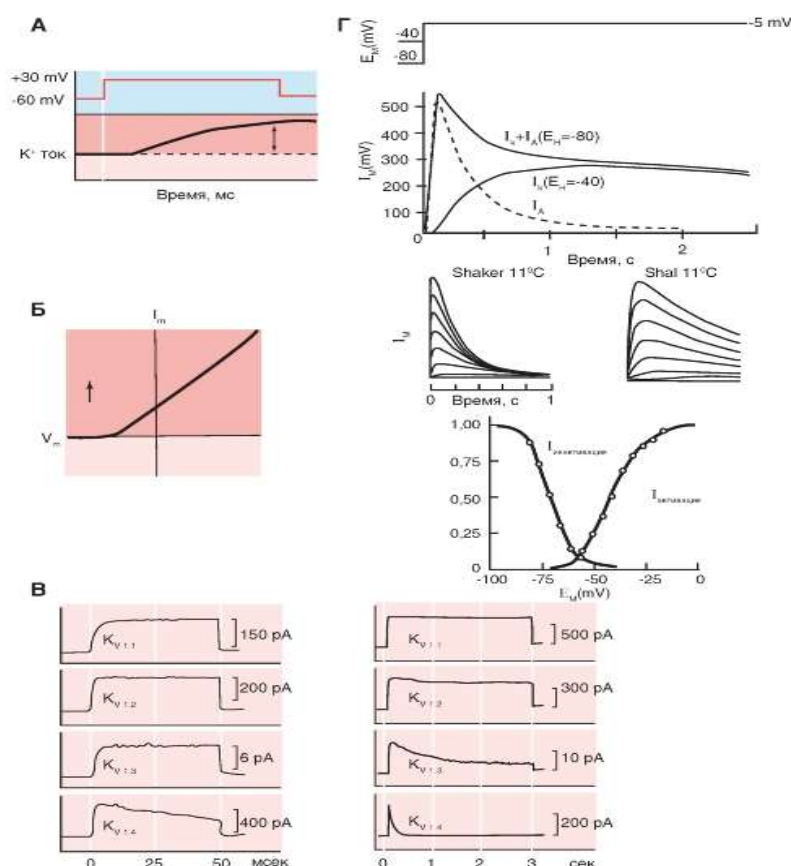
Обсудим некоторые данные, характеризующие работу первого типа потенциалуправляемых K⁺-каналов - K⁺-каналов задержанного выпрямления (*delayed outward rectifier K⁺-channels* - I_K). Этот тип каналов отличается тем, что деполяризующие ступеньки активируют ток, но с задержкой, как это видно на рис. 1-76 А. Вольтамперная кривая, полученная на основе экспериментов, выполненных методом *patch-clamp* в конфигурации *whole-cell*, однозначно демонстрирует наличие K⁺-каналов задержанного выпрямления (*delayed outward rectifier K⁺-channels* - I_K). Ток течет только в выходящем направлении, как это показано на рис. 1-76 Б. Для оценки тока, текущего через каналы этого типа из клеток мозга млекопитающих, различные каналы (K_V1.1,

K_V1.2, K_V1.3 и K_V1.4) экспрессировали в ооциты ксенопуса. Результаты экспериментов, в которых потенциал смещался от -80 мВ до 0 мВ, показаны на рис. 1-76 В. Левая панель, представленная с большой степенью разрешения времени, демонстрирует, что некоторые из этих каналов активировались более медленно, чем другие. Правая панель, ужатая во времени, позволяет увидеть, что инактивация ускорилась от канала K_V1.1 к каналу K_V1.4.

Транзиторные K⁺-каналы

Данные, характеризующие работу второго типа K⁺-каналов, - быстрых транзиторных K⁺-каналов выходящего тока (*fast transient K⁺-channels (currents)* - I_A, или *transient outward current* - I_{to}) представлены на рис. 1-76 Г. Показаны результаты экспериментов, позволяющие построить кривую активации этого тока и его инактивации.

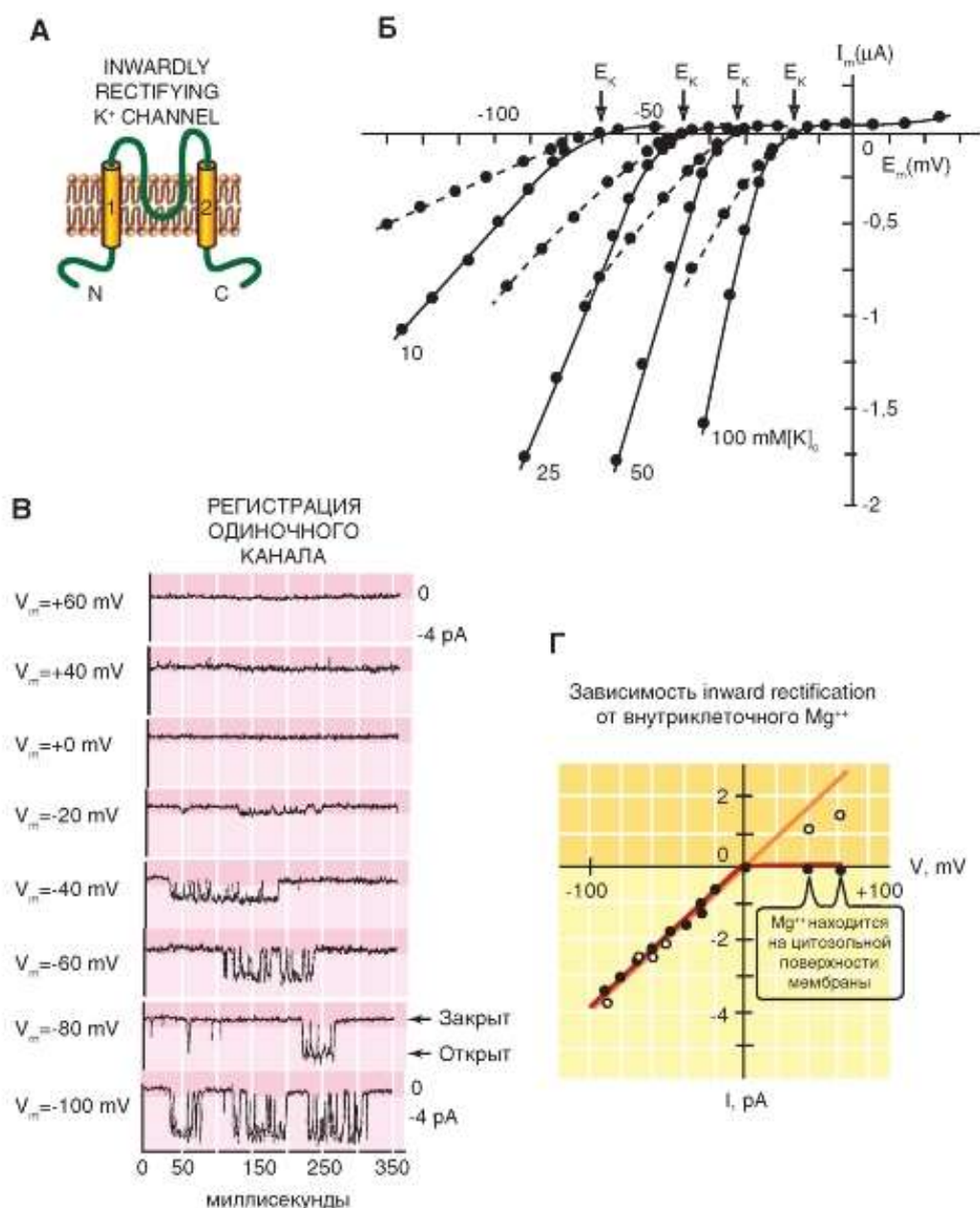
Рис. 1-76. Потенциалуправляемые K⁺-каналы (K_V), относящиеся к типу K⁺-каналов задержанного выпрямления (*delayed outward rectifier K⁺-channels* - I_K) и к типу быстрых транзиторных K⁺-каналов выходящего тока (*fast transient K⁺-channels currents* - I_A, или *transient outward current* - I_{to}



K_{ir}-каналы

Класс трансмембранных белков с двумя сегментами включает 2S белки, образующие *inward rectifiers channels* (K_{ir}), которые можно назвать «K⁺-каналами аномального выпрямления с током входящего направления». Терминалы N- и C- этих каналов расположены в цитоплазме, Р-петля между двумя трансмембранными сегментами формирует пору, и функционирующий канал представляет собой тетрамер этих 2S/1Р субъединиц (рис. 1-77 А). Вольтамперные характеристики при различных величинах [K⁺]_о, характерные для этого типа каналов, представлены на рис. 1-77 Б. Там же показано значение E_к для каждой величины [K⁺]_о. На рисунке 1-77 В изображена зависимость открытия каналов от потенциала, а на рис. 1-77 Г представлена вольтамперная характеристика этого типа каналов.

Рис. 1-77. K⁺-каналы аномального выпрямления с током входящего направления (*inward rectifier K⁺-channels* - K_{ir})



Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы

Еще один тип K⁺-каналов - так называемые Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы. Примером такого канала может служить, например, канал (Slo или Slo1). Slo имеет 7S и кодирует высокопроводящий канал, Slo (0S-6S). В этом канале Р-область находится между SVI и SVII; функционирующий канал представляет собой тетрамер, но, в отличие от других каналов, Slo имеет N-терминаль, расположенную во внеклеточной среде (рис. 1-78 А).

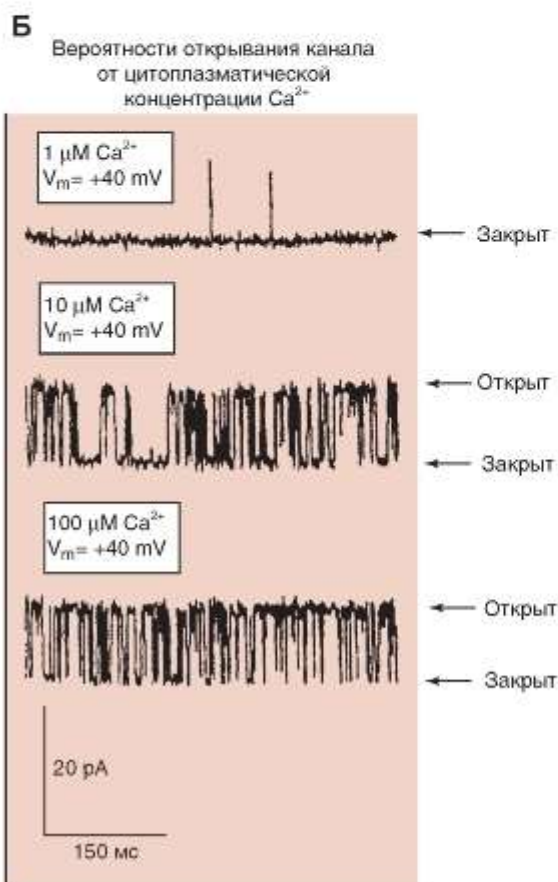
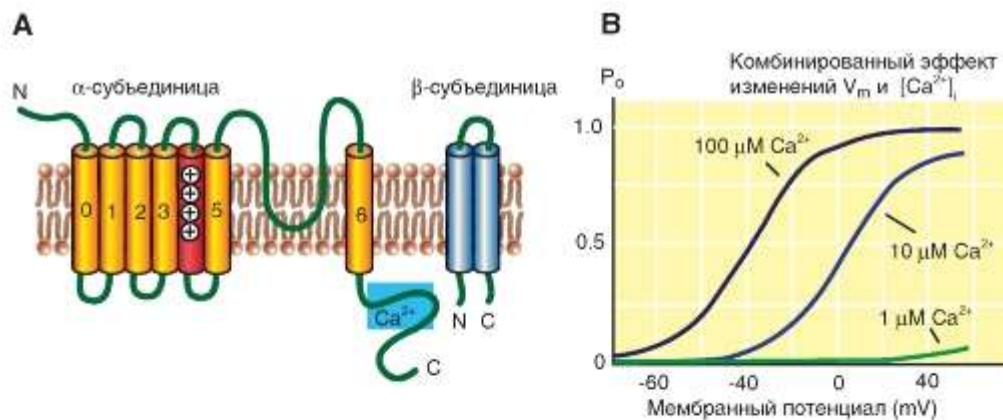
Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы описаны достаточно давно и включают два подтипа. Одна из этих групп включает три K_{Ca}-канала с низкой проводимостью (K_{Ca}2.1, K_{Ca}2.2, и K_{Ca}2.3) и канал K_{Ca}3.1 с промежуточной проводимостью. Эти каналы непотенциалуправляемые и активируются низкими концентрациями внутриклеточного Ca²⁺ (<1,0 μM), в отличие от K_{Ca}1.1 (KCNMA1, Slo1), который активируется и потенциалом, и внутриклеточным Ca²⁺. Эти три K_{Ca}-канала с низкой проводимостью чувствительны к блокирующему действию апамина (100 пМ-10 нМ), что отличает их от всех других K_{Ca}-каналов. И K_{Ca}-каналы с низкой проводимостью, и каналы с промежуточной проводимостью играют важную роль во многих процессах, включающих Ca²⁺-зависимый сигналинг в электровозбудимых и электроневожудимых клетках. Они не связывают свободные ионы Ca²⁺ непосредственно, а скорее, обнаруживают Ca²⁺ через кальмодулин, который постоянно связан с С-терминальным регионом. Связывание кальция с таким кальмодулином приводит к конформационным изменениям, ответственным за воротный механизм канала.

Вторая группа K_{Ca}-каналов включает K_{Ca}1.1 (Slo или Slo1), K_{Ca}4.1 (Slack или Slo2.2), K_{Ca}4.2 (Slick или Slo2.1) и K_{Ca}5.1 (Slo3). Каналы K_{Ca}1.1 изучали в клетках мозга, улитки и мышцах, и известно, что варианты альтернативного сплайсинга их мРНК ответственны за их значительные функциональные различия. В отличие от K_{Ca}2 и каналов, связывание ионов Ca²⁺ каналом K_{Ca}1.1 не зависит от его ассоциации с кальмодулином, но полагают, что определяется, по крайней мере, тремя связывающими двухвалентные катионы участками в цитоплазматической карбоксильной области каждой субъединицы канала. Два независимых высоко чувствительных Ca²⁺-связывающих участка, названных «*calcium bowl*», сформированы отрицательно заряженными сегментами в дистальной карбоксильной терминали белка и внутри первой RCK области (RCK: Regulator of Conductance for K⁺), кодирующей проксимальную С-терминаль белка. Третий низкоафинный связывающий двухвалентные катионы участок также найден в первой RCK области.

Хотя три других члена этой группы, K_{Ca}4.1, 4.2, и 5.2, были включены в K_{Ca}-спецификацию, так как все они являются членами этой структурно связанной группы генов, но в отличие от K_{Ca}1.1 активирующихся внутриклеточным Ca²⁺, ни один из вышеупомянутых каналов, повидимому, не может быть им активирован. Эти три нечувствительные к внутриклеточному Ca²⁺ канала активируются иначе. K_{Ca}4.2 и K_{Ca}4.1 активируются внутриклеточными ионами Na⁺ и Cl⁻, а K_{Ca}5.1 - внутриклеточным защелачиванием (сдвигом рН в щелочную сторону).

На рисунке 1-78 Б показаны токи через одиночные Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы, Вероятность открытия каналов значительно повышается с увеличением концентрации Ca²⁺. На рис. 1-78 В показана зависимость вероятности открытия канала от потенциала на фоне различной концентрации Ca²⁺.

Рис. 1-78. Ca²⁺-активируемые K⁺-каналы (K_{Ca})



Канал утечки - K_2P

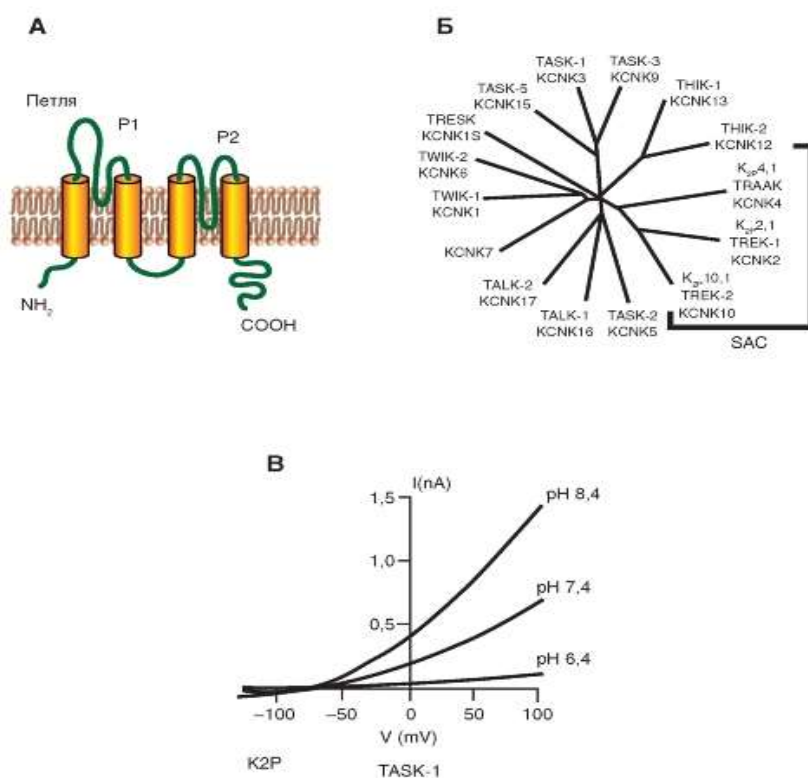
Каналы утечки представляют собой особую группу ионных каналов. Это одни из немногих каналов, о которых около 50 лет, т.е. со времени возникновения представлений о них, было мало что известно. Они имеют потенциалнезависимую основу и калиево-натриевую проводимость. В работах Б. Хилле (B. Hille) отмечено, что уже А. Ходжкин и А. Хаксли на фоне потенциала покоя демонстрировали небольшой компонент тока, приписываемый ими так называемому току утечки I_l (leak current). Этот ток был небольшим и имел потенциалнезависимый механизм ионной проводимости. А. Ходжкин и А. Хаксли не установили ионную основу тока утечки. Было только показано, что на фоне потенциала покоя мембрана клетки относительно проницаема для ионов калия, выходящих из клетки, и крайне плохо (в 100 раз меньше) проницаема для ионов натрия, входящих в клетку. Эту проницаемость традиционно считали потенциалнезависимой и нечувствительной к ТЕА утечкой. Ток утечки, активный в покое, стабилизирует мембранный потенциал ниже порога генерации потенциалов действия и ускоряет

реполяризацию. Еще А. Ходжкин и А. Хаксли назвали эту структуру каналом утечки. С такими каналами связывают формирование потенциала покоя. Белковая структура, через которую осуществляется ток утечки, определена лишь несколько лет назад. Идентификация каналов, через которые осуществляется ток утечки, выявила, что это K^+ -каналы с двумя пороформирующими петлями в каждой субъединице и

четырьмя трансмембранными сегментами, как это показано на рис. 1-79 А. Две таких субъединицы формируют канал, названный K_{2P} . Это K^+ -елективный канал с определенными параметрами проводимости, т.е. с потенциалнезависимым воротным механизмом, и предсказанным 50 лет назад выпрямлением. При физиологических условиях (высокая концентрация ионов K^+ внутри и низкая снаружи) K_{2P} проводит более значительный ток из клетки, чем внутрь клетки. Наблюдается поток ионов, направленный в большей степени наружу, чем внутрь клетки. Как ожидалось, для регуляторов возбудимости K_{2P} -каналы находятся под сильным контролем множества химических и физических стимулов, включая напряжение кислорода в среде рН, липиды, механические растяжения, нейротрансмиттеры и рецепторы, связанные с G-белком. Каналы также служат молекулярными мишенями для некоторых летучих и местных анестетиков. Регуляция K_{2P} -каналов связана с изменениями в их свойствах, например вероятности открытия каналов. Тем не менее некоторые регуляторные изменения, например фосфорилирование K_{2P} , обеспечивают появление выпрямляющих свойств с чувствительностью к потенциалу.

На рисунке 1-79 Б представлена классификация K_{2P} -каналов, причем часть из них, отмеченная на рисунке, проявляет механосенситивность. Наконец, на рис. 1-79 В показаны типичные вольтамперные характеристики, имеющие выпрямление. На нем представлено изменение вольтамперных характеристик в зависимости от величины рН для канала TASK-1, принадлежащего семье K_{2P} -каналов.

Рис. 1-79. K^+ -каналы с двумя петлями в домене (two-P K^+ -channels - K_{2P})

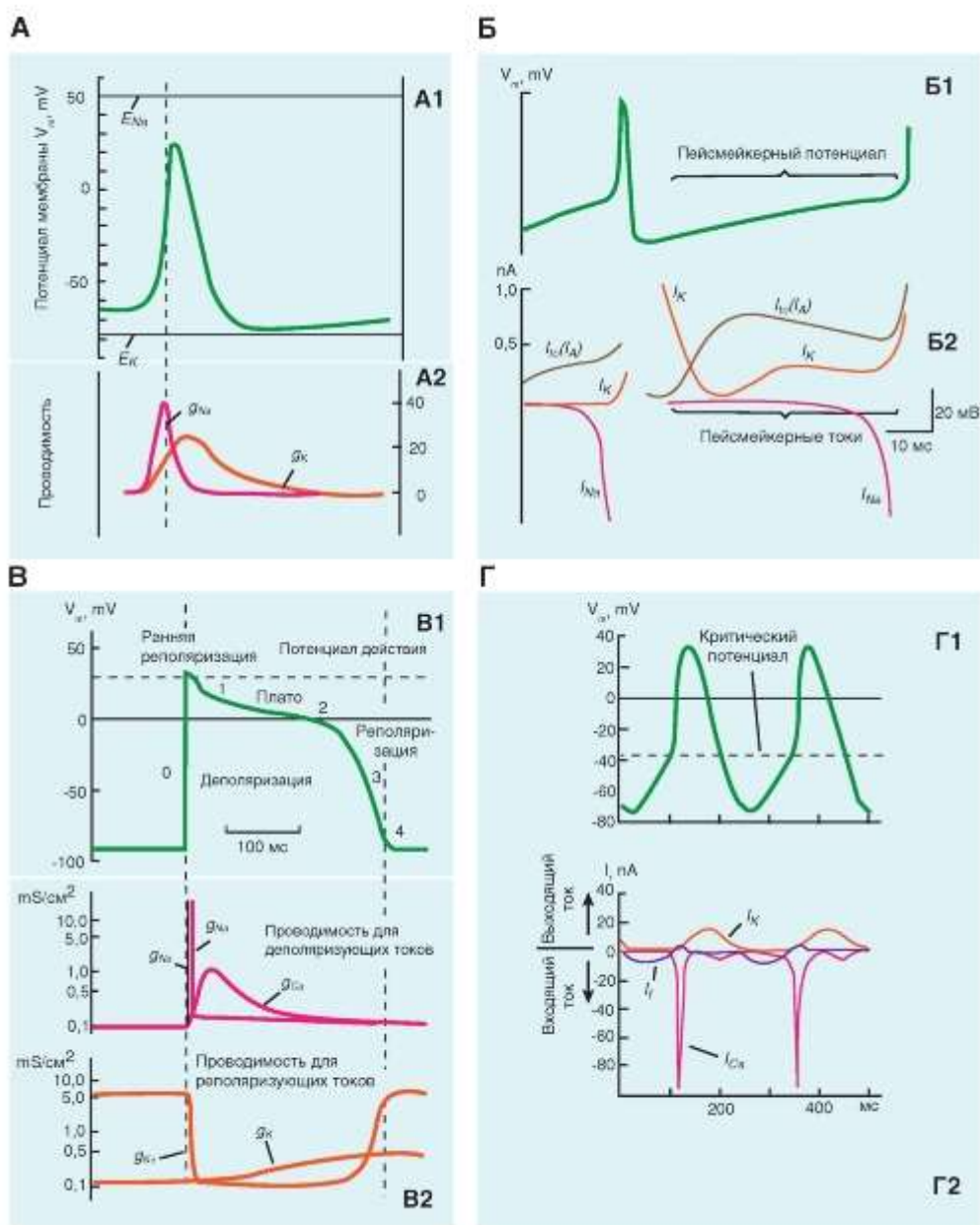


Потенциалы действия и токи, их формирующие

Рис. 1-80. Связь одиночного потенциала действия с основными ионными токами у разных клеток.

А - связь одиночного потенциала действия (A1) нервной клетки с ионными токами (A2). A1 - потенциал действия. Прямыми линиями помечены равновесный натриевый и калиевый потенциалы. A2 - две компоненты ионных токов, показанные через проводимость: входящий Na^+ -ток, осуществляемый через потенциалуправляемые Na^+ -каналы, и выходящий K^+ -ток, осуществляемый через потенциалуправляемые K^+ -каналы. На уровне критического потенциала наблюдается активация входящего Na^+ -тока, который инактивируется, когда мембранный потенциал достигнет положительных значений. Инактивация входящего Na^+ -тока происходит одновременно с активацией выходящего K^+ -тока. После достижения мембранного потенциала уровня потенциала покоя выходящий K^+ -ток инактивируется. Б - связь потенциала действия и самопроизвольного смещения мембранного потенциала до уровня критического потенциала с некоторыми ионными токами у нервной клетки с самопроизвольной ритмической активностью. Б1 - потенциал действия клетки с регулярной ритмической активностью. Б2 - компоненты ионных токов, формирующих этот потенциал действия. Показаны входящий Na^+ -ток (I_{Na}), создающий фазу деполяризации потенциала действия, выходящий K^+ -ток (I_{K}), формирующий фазу реполяризации потенциала действия и быстрый временный выходящий K^+ -ток (I_{to}). Потенциал мембраны такой клетки определяется активностью 6 токов, которые были обнаружены у клеток с ритмической активностью. Во-первых, это, разумеется, ток, генерируемый электрогенным Na^+ , K^+ -насосом мембраны, и выходящий K^+ -ток утечки, создающие мембранный потенциал покоя. Кроме того, это входящий Na^+ -ток (или в отдельных случаях входящий - Ca^{2+} -ток), формирующий фазу деполяризации потенциала действия, и так называемый выходящий K^+ -ток (I_{K}), формирующий фазу реполяризации потенциала действия. Наконец, это два типа ионных токов, смещающих мембранный потенциал до уровня критического потенциала в период между потенциалами действия. Первый тип - это сильный входящий Na^+ -ток, текущий по другим каналам, нежели вышеописанные и формирующие фазу деполяризации потенциала действия. Именно этот ионный ток смещает мембранный потенциал в сторону деполяризации к критическому потенциалу. К другому типу относится быстрый транзиторный выходящий K^+ -ток (fast transient K^+ -current - I_{A} , или transient outward current - I_{to}), инактивация которого устраняется следовой гиперполяризацией и который активируется в промежутке между двумя потенциалами действия в подпороговой области мембранного потенциала. Кроме этих шести описанных ионных токов существуют еще два: медленный Na^+ -ток и медленный K^+ -ток. Эти медленные токи приводят к самоподдерживающимся осцилляциям мембранного потенциала, лежащим в основе периодических пачечных разрядов нейронов. В - связь потенциала действия клетки рабочего миокарда с ионными токами. В1 - форма потенциала действия рабочего кардиомиоцита. В2 - изменение во времени проводимости для деполяризующих (верхняя панель) или реполяризующих (нижняя панель) ионных токов во время потенциалов действия. Нарастание потенциала действия возникает, когда стимул выше порогового быстро деполяризует мембрану, активируя быстрые Na^+ -каналы, поэтому фаза быстрой деполяризации связана с входом Na^+ в кардиомиоцит за счет резкого увеличения g_{Na} . Входящий Na^+ -ток, осуществляемый через потенциалуправляемые Na^+ -каналы, не только очень быстро активируется, но и также быстро инактивируется. Инактивация Na^+ -каналов потенциалзависимая и происходит при достижении фазы деполяризации, достигает значений +25-30 мВ. Такая кинетика входящего Na^+ -тока определяет практически вертикальную форму фазы деполяризации потенциала действия. Фаза ранней или частичной реполяризации происходит за счет выхода K^+ через ионные каналы мембраны, проводящие транзиторный выходящий ток (I_{to}). В результате такого транзиторного выхода

положительно заряженных ионов клетка на короткое время частично реполяризуется. Эта частичная реполяризация активирует входящий Ca^{2+} -ток, и у потенциала действия начинается фаза плато. Г - связь потенциала действия узловой клетки сердца с ионными токами. В основе спонтанных изменений мембранного потенциала (Г1) в синоатриальном узле лежат три тока (Г2): неселективный входящий ток (I_f), который переносится катионами и не блокируется ТТХ, медленный входящий Ca^{2+} -ток (I_{Ca}) и выходящий K^+ -ток (I_K)



Механосенситивные потенциалы

На рисунке 1-81 А показана непрерывная регистрация биоэлектрической активности изолированного кардиомиоцита левого желудочка мыши в условиях его растяжения на 6 и 8 μm , полученная методом patch-clamp в конфигурации *whole-cell*. Показано изменение потенциала покоя и потенциала действия клетки при ее дискретном растяжении. Кроме того, возникают экстра-потенциалы действия.

В нормальном растворе Тироде с использованием *patch-clamp* в конфигурации *whole-cell* изолированные кардиомиоциты здорового желудочка морской свинки отвечают на растяжение изменением величины потенциала покоя и длительности потенциала

действия. Показано, что растяжение на 2 и 4 μm не меняет величину потенциала покоя и форму потенциала действия кардиомиоцитов. Растяжение на 6 μm деполяризует покоящуюся мембрану в среднем на 3 мВ (рис. 1-81 Б1), а растяжение на 8 μm деполяризует в среднем на 6 мВ (рис. 1-81 Б2). Растяжение на 8 μm удлиняют средние значения APD90 (*Action potential duration* - длительность амплитуды потенциала действия на уровне 90% фазы реполяризации) от 360 до 502 мс. Кроме того, растяжение на 8 μm и далее на 10 μm запускает экстрапотенциалы действия, начинающиеся от диастолической деполяризации.

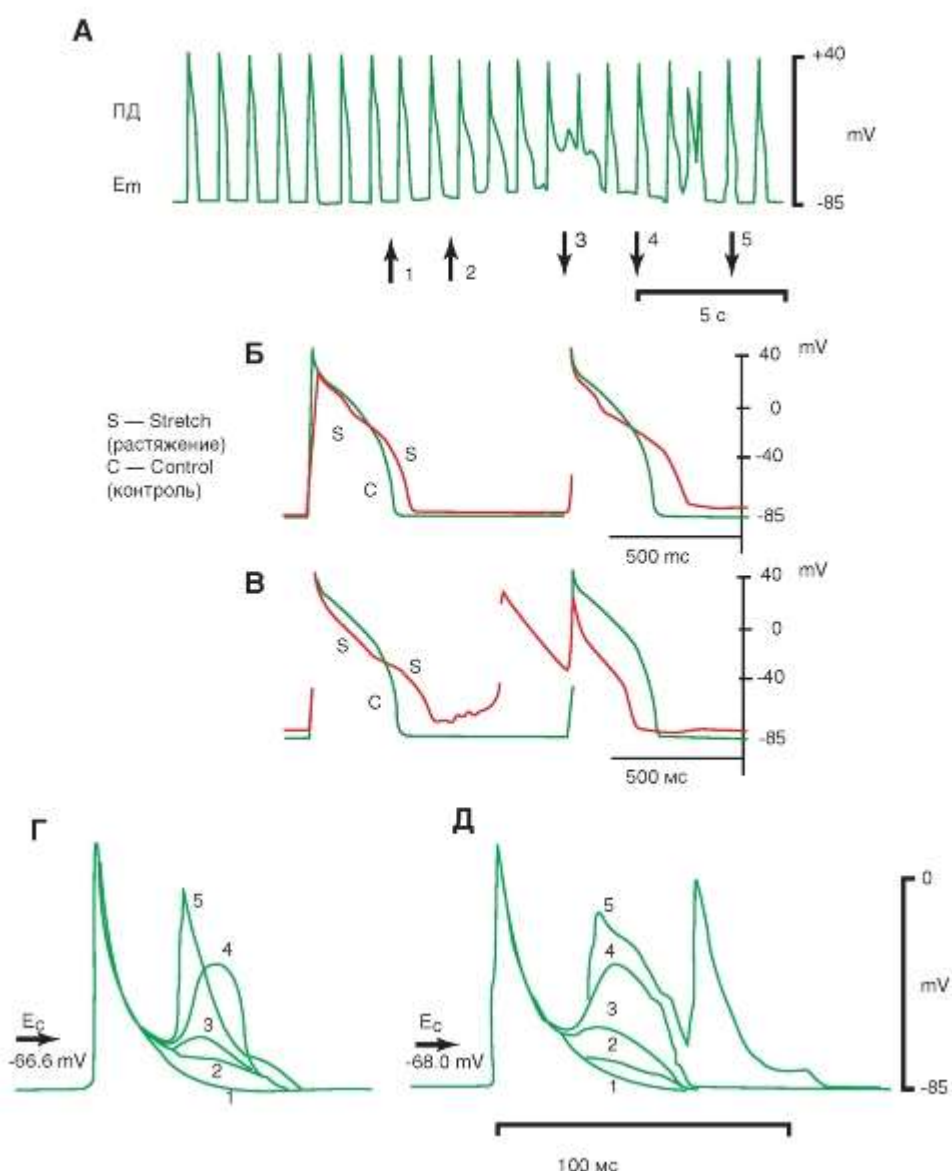
Далее представлена (рис. 1-81 В) динамика развития одного экстрапотенциала действия в правом предсердии крысы, перенесшей инфаркт миокарда, при увеличении степени растяжения (1-5) препарата. Второй потенциал возникает при достижении SID (*stretch-induced depolarization* - механоиндуцированная деполяризация) критического уровня деполяризации ($E_c = -66,6$ мВ).

Механоиндуцированные экстрасистолы и фибрилляция связаны с развитием SID, которая появляется на уровне APD90. Показано, что растяжение ткани прямо вызывает аритмию. SID, возникающая на уровне APD90, соответствует поздней фазе реполяризации, когда инактивация потенциалуправляемых Na^+ -каналов уже исчезла. Относительно большие различия между мембранным потенциалом, принадлежащим APD90, и равновесным потенциалом для механосенситивных токов, могут способствовать генерации развития эффективной движущей силы для токов, входящих через МСК и соответственно способствовать развитию SID. SID на уровне APD90 может деполяризовать мембрану до порога вследствие активации быстрых Na^+ -токов и приводить к генерации дополнительных потенциалов действия. Снятие растяжения ткани полностью устраняло эти механоиндуцированные изменения потенциала действия.

На рисунке 1-81 Д также представлена динамика развития одного экстрапотенциала действия кардиомиоцита правого предсердия крысы, перенесшей инфаркт миокарда, при увеличении степени растяжения (1-5) препарата. Второй потенциал возникает после окончания периода абсолютной рефрактерности клетки при достижении в этот период SID критического уровня деполяризации ($E_c = -67,7$ мВ).

Рис. 1-81. Индуцированные механическим растяжением клетки потенциалы кардиомиоцитов.

А - влияние растяжения изолированного кардиомиоцита левого желудочка мыши на потенциал покоя и потенциал действия в условиях его растяжения. Запись получена методом *patch-clamp* в конфигурации *whole-cell*. Символ « \uparrow » маркирует моменты увеличения растяжения клетки (на 6 μm и 8 μm), а символ « \downarrow » - моменты возвращения к исходному растяжению. AP - потенциал действия, E_m - потенциал покоя. Б - механоиндуцированная деполяризация мембраны изолированного кардиомиоцита, удлинение потенциала действия и возникновение экстрапотенциалов действия, зарегистрированные методом *patch-clamp* в конфигурации *whole-cell*. Б - кардиомиоцит правого желудочка морской свинки, растянутый на 6 μm . Показано изменение величины потенциала покоя и формы AP (красная кривая). В - кардиомиоцит правого желудочка морской свинки, растянутый на 8 μm . Продemonстрировано изменение величины потенциала покоя, формы AP и возникновение экстра-AP (красная кривая). Г - динамика преобразования механоиндуцированной деполяризации на уровне APD90 в потенциал действия (AP) при различных степенях (1-5) растяжения препарата. E_c - критический уровень деполяризации. Д - динамика появления механоиндуцированной деполяризации на уровне APD90 (*Action potential duration* - длительность потенциала действия на уровне 90% фазы реполяризации) и его роль в формировании потенциала действия (AP) при различных степенях (1-4) растяжения препарата. E_c - критический уровень деполяризации



Механосенситивные токи

На рисунке 1-82 А показаны оригинальные кривые, полученные методом *patch-clamp* в конфигурации *whole-cell* на кардиомиоците желудочка до его растяжения (фиолетовая кривая) и после его растяжения (красная кривая). Из рисунка следует, что растяжение кардиомиоцита приводит к смещению в негативную область тока, возникающего при поддерживаемом потенциале. Это свидетельствует о наличии входящего тока через

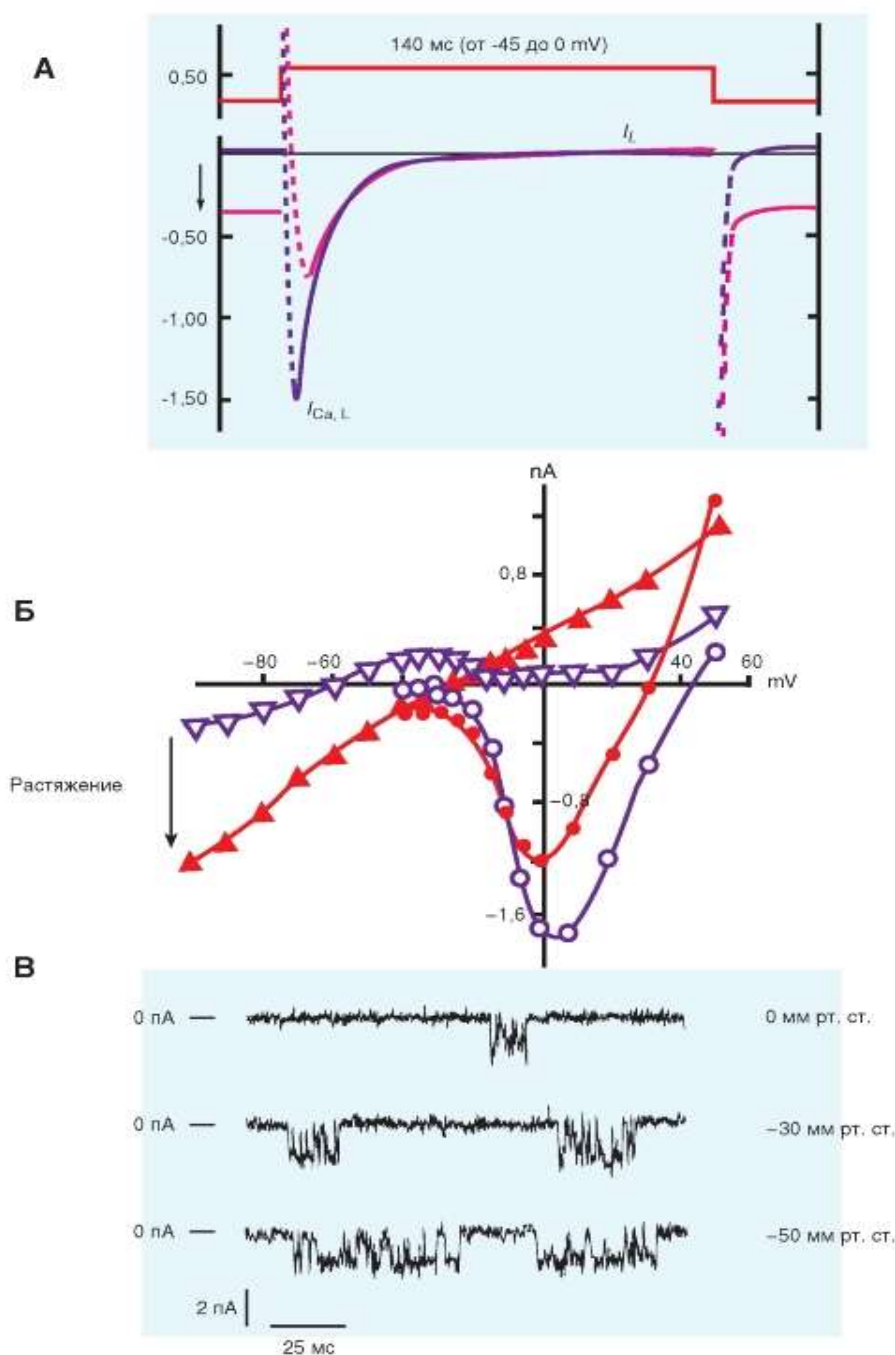
МСК.

Далее (рис. 1-82 Б) представлен типичный пример изменения вольт-амперной кривой кардиомиоцита человека до растяжения (фиолетовые треугольники, объединенные кривой) и при его растяжении (красные треугольники, объединенные кривой). Смещение кривой в области отрицательных потенциалов свидетельствует о наличии входящего ионного тока через МСК.

На рис. 1-82 В показаны SAC клеток сердца, которые активируют его приложением давления в *patch*-пипетку, находящуюся в конфигурации *cell-attached*.

Рис. 1-82. Механосенситивные токи и каналы.

А - оригинальные кривые, полученные методом *patch-clamp* в конфигурации *whole-cell* на кардиомиоците левого желудочка морской свинки до (фиолетовая кривая) и после его растяжения (красная кривая). Смещение тока при поддерживаемом потенциале показано стрелкой. На рисунке показан L-тип Ca^{2+} -тока и поздний ток (I_L), причем компонент K^+ -тока в позднем токе подавлен ионами Cs. Na^+ -ток подавлен поддерживаемым на уровне -45 мВ потенциалом. Мембранный потенциал смещался от поддерживаемого потенциала (-45 мВ) до 0 мВ. Б - активация неселективного катионного тока при растяжении на 4 μm кардиомиоцита левого желудочка человека в условиях подавленного ионами Cs калиевого тока. I-V кривые поздних токов, измеренных в конце 140 мс импульса (I_L отмечены треугольниками), и I-V кривые, характеризующие работу L-типа Ca^{2+} -каналов ($I_{\text{Ca-L}}$ отмечены кружочками). I-V кривые мембранных токов до растяжения - фиолетовые кривые, а на фоне растяжения клетки на 4 μm - красные кривые. В - активируемые растяжением *stretch-activated channels* (SAC) клеток сердца. SAC активировался во время приложения негативного давления в patch-пипетку



Миелинизированное волокно

Для понимания механизмов проведения по нервным волокнам возбуждения необходимо учитывать как электрические, так и морфологические особенности аксонов нервных клеток. Несмотря на все разнообразие нервных волокон, их можно разделить на два класса: немиелинизированные и миелинизированные волокна. Мембрана немиелинизированного нервного волокна напрямую контактирует с внешней средой, таким образом, обмен ионами между внутри- и внеклеточной средами (ионные токи через плазматическую мембрану) может происходить в любой точке немиелинизированного нервного волокна. В случае же миелинизированных нервных волокон большая часть мембраны аксона покрыта жировой оболочкой как изолятором, и лишь сравнительно небольшие участки мембраны, названные перехватами Ранвье, свободны от миелина. Миелинизированное нервное волокно контактирует с внешней средой только в области перехватов Ранвье.

Миелинизация нервного волокна играет огромную роль в нервной системе, а нарушение миелиновой оболочки приводит к фатальным патологическим процессам, механизм которых до настоящего времени подвергается интенсивному изучению, поэтому мы рассмотрим подробно миелиновую оболочку и ее формирование.

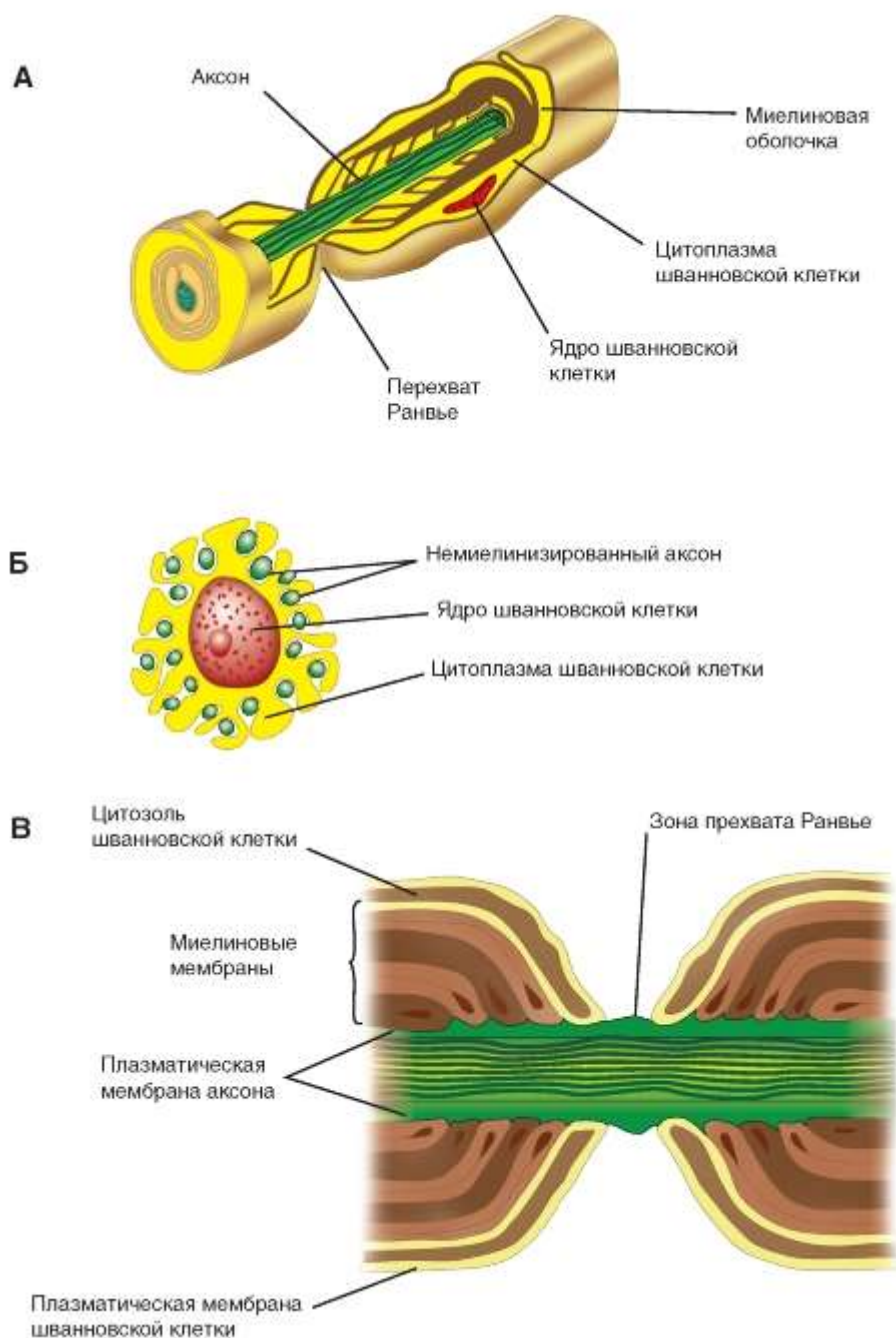
На рисунке 1.83 А представлен фрагмент миелинизированного аксона и выделен перехват Ранвье. Миелиновая оболочка создается в результате того, что шванновская клетка (или иначе миелоцит) многократно обертывает аксон. При этом образуются слипающиеся слои и тем самым формируется миелиновая оболочка. Далее представлены структуры шванновской клетки (рис. 1-83 Б).

Миелин в периферической нервной системе конструируется другими уникальными протеинами мембраны. Миелин, окружающий каждый миелинизированный аксон, формируется из многих глиальных клеток. Каждый регион миелина формируется одиночной глиальной клеткой и отделен от следующего региона немиелинизированным участком, названным перехватом Ранвье. Только в этом участке аксональная мембрана напрямую контактирует с экстрацеллюлярной жидкостью (рис. 1-83 В).

Миелиновая оболочка может быть достаточно толстой и состоять из 50-100 мембран, играющих роль электрического изолятора аксона, т.е. предотвращающего перенос ионов между цитозолем аксона и экстрацеллюлярной жидкостью. Как следствие электрическая активность в аксоне ограничена только зоной мембраны перехвата Ранвье, именно того места, где ионы могут проходить через мембрану. Этот участок мембраны имеет большую плотность потенциалуправляемых Na^+ -каналов, около 10 000 на 1 мкм^2 аксональной плазматической мембраны, тогда как участки аксональной мембраны между перехватами Ранвье имеют очень незначительное количество ионных каналов.

Суммарный диаметр аксона, покрытого миелиновой оболочкой, обычно составляет около 20 мкм . Длина перехвата Ранвье достигает 2 мкм , а миелинизированный промежуток между двумя перехватами Ранвье составляет около 2000 мкм .

Рис. 1-83. Схема строения миелинизированного нервного волокна (А), шванновской клетки (Б) и структура перехвата Ранвье (В)



Шванновская клетка

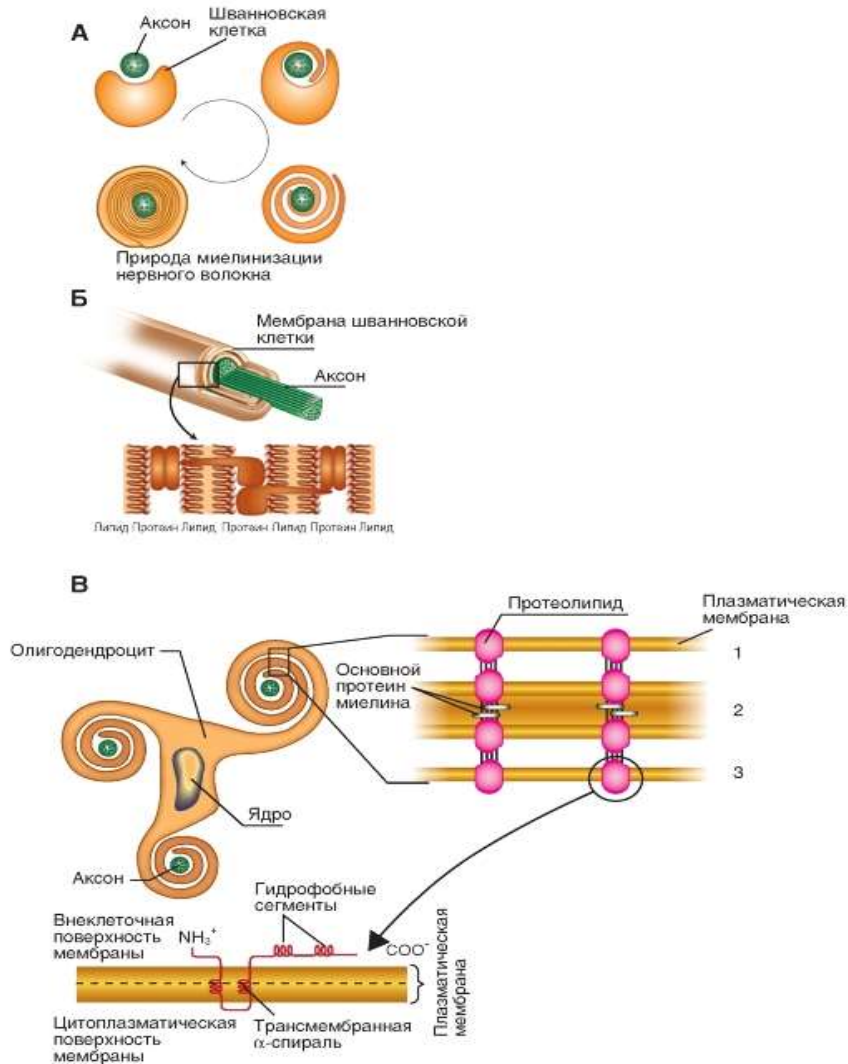
Миелин представляет собой упаковку листов специфических плазматических мембран, продуцируемых глиальными клетками, которые обертываются вокруг себя и аксона (в определенном смысле в виде архимедовой спирали), что и показано на рисунке. В периферической нервной системе глиальные клетки называются шванновскими клетками.

На рисунке 1-84 А показано, как в процессе развития нервной системы большая шванновская клетка обертывает аксон нейрона. Дальнейший рост мембраны шванновской клетки вместе с ее вращением вокруг аксона образует слоистую спираль с двойной плазматической мембраной вокруг аксона. Таким образом, миелин представляет собой слой относительно богатых фосфолипидами плазматических мембран шванновской клетки. Далее (рис. 1-84 Б) показаны схема аксона, окруженного шванновской клеткой, и профиль слоев мембраны, образующий миелин.

Часто несколько аксонов окружены глиальной клеткой (рис. 1-84 В). Как у позвоночных, так и у некоторых беспозвоночных животных глиальные клетки сопровождают аксоны по всей длине. Но специализация этих глиальных клеток в форме миелина преобладающе встречается у позвоночных. Глиальные клетки позвоночных, позднее формирующие миелин, имеют на своей поверхности миелинассоциированный гликопротеин и другие протеины, связывающиеся с соседними аксонами и вызывающими формирование миелина. Миелиновая мембрана, подобно всем мембранам, содержит бислой фосфолипидов, но миелин содержит только несколько типов протеинов. Основной протеин миелина и протеолипид обнаружили только в миелине в центральной нервной системе, и их наличие позволяет плазматическим мембранам плотно упаковываться вместе.

Рис. 1-84. Рост мембраны шванновской клетки и формирование миелиновой оболочки аксона.

А - рост мембраны шванновской клетки вместе с ее вращением вокруг аксона нерва. Б - профиль слоев мембраны, образующий миелин. В - формирование миелиновой оболочки аксона. Посредством вращательного движения вокруг близлежащих аксонов и вокруг себя мембрана одного олигодендроцита окружает несколько аксонов и, таким образом, формирует их миелиновую оболочку. Г - молекулярная структура упаковки миелина. Д - каждая молекула протеолипида (276 аминокислотных остатков) имеет две мембранных α -спирали, каждая из которых содержит около 30 аминокислотных остатков. Через них осуществляется протеолипид-протеолипид взаимодействия



Распространение по аксону пассивного электротонического потенциала

Пассивный электротонический потенциал распространяется по нервному волокну на небольшие расстояния, причем его амплитуда, скорость нарастания и падения с расстоянием уменьшаются, т.е. распространение происходит с затуханием. На рисунке 1-85 А представлена схема немиелинизированного волокна, которая для удобства обсуждения механизма распространения пассивного электротонического потенциала разбита на фрагменты, каждый из которых включает один потенциалуправляемый Na^+ -канал (показан розовым цветом), находящийся в состоянии покоя, один потенциалуправляемый K^+ -канал (показан желтым цветом), находящийся в состоянии инактивации, и один канал утечки (показан коричневым цветом), через который осуществляется выход ионов K^+ во внешнюю среду.

Сопротивление аксоплазмы (r_{in}) и наружной среды (r_{out}) очень мало, и ими можно в определенном смысле пренебречь. Обычно рассматривают лишь один элемент мембраны, включающий ее емкость (C_m) и сопротивление (R_m), но надо помнить, что мембрана аксона состоит из огромного количества подобных элементов, связанных между собой и образующих непрерывный кабель (см. рис. 1-85 Б). Можно заметить, что реально каждый такой элемент имеет, помимо емкости мембраны (C_m), сопротивление потенциалуправляемого Na^+ -канала (R_{Na}), натриевую батарею (V_{Na}), сопротивление потенциалуправляемого K^+ -канала (R_{K}), калиевую батарею (V_{K}), сопротивление канала утечки - K_2P -канала (R_l), батарею канала утечки (V_l). Однако в покоящемся аксоне большинством этих элементов можно пренебречь, оставив лишь емкость мембраны (C_m) и сопротивление мембраны (R_m), которые будут определяться прежде всего сопротивлением открытых каналов утечки (R_l), как наиболее меньшим. Сопротивление канала утечки (R_l) можно оставить для демонстрации движения ионов по круговым локальным токам через эти каналы в невозбужденных участках мембраны аксона.

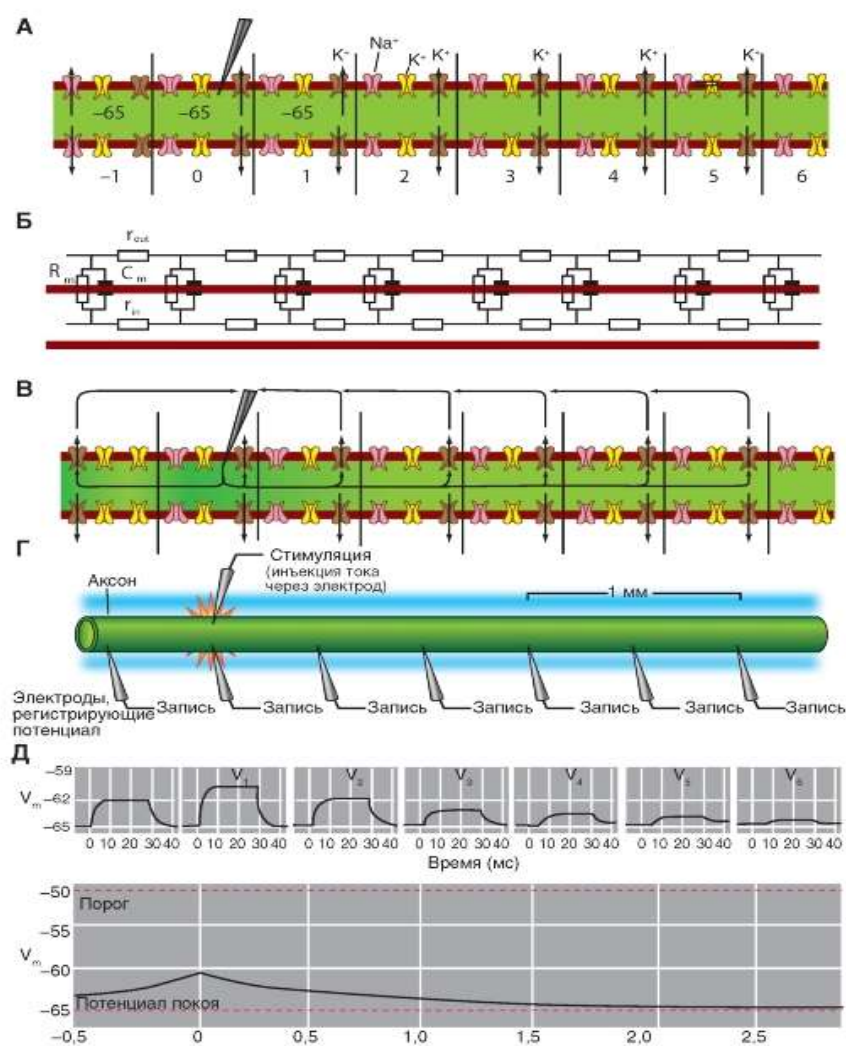
Аксоплазма и наружная среда клетки, будучи электролитами, оказываются хорошими проводниками. В покоящемся аксоне они становятся эквипотенциальными, т.е. разность потенциалов на мембране будет одинакова во всех фрагментах (точках) волокна (например, -65 мВ). Если в зону (точку 0) аксона ввести микроэлектрод и изменить разность потенциалов на мембране в этой зоне (рис. 1-85 В), тогда соседние зоны (1) и более удаленные зоны (2, 3, 4 и так далее) окажутся неэквипотенциальными, и между ними потечет ток. Этот ток станет уменьшать возникшую разность потенциалов и одновременно менять потенциал в соседних и прилегающих областях. Влияние тока будет уменьшаться по мере удаления от зоны (0).

Поскольку внутриклеточная среда служит проводником, входящий в зону 0 небольшой ток (сдвигающий потенциал покоя от -65 до -55 мВ, т.е. в подпороговой области) распространяется в обе стороны от этого участка. Так как мембрана нервного волокна не идеальный изолятор, распространяющиеся токи начнут покидать волокно через единственно открытые каналы утечки, т.е. возникнут выходящие токи. Если этот локальный, входящий в данном случае через микроэлектрод, ток подпороговый, он вызывает возникновение пассивного электротонического потенциала и распространяется с затуханием. Линии на рис. 1-85 В показывают части локальных кругов тока, текущего между слегка деполяризованной и недеполяризованной областями внутри и снаружи аксона и через зоны мембраны, находящиеся в покое (зоны 1), а также на большем удалении (зоны 2, 3, 4 и т.д.). Как будут замыкаться эти линии? Поскольку внешняя среда соединена так или иначе с минусом входа усилителя, то локальные круги тока замкнутся через электронно-измерительную схему на микроэлектроде.

Изменения мембранного потенциала (рис. 1-85 Г) измеряются регистрирующими электродами у основания аксона (V_1) и в различных точках вдоль него (V_2, V_3, V_4, V_5, V_6), а график этих изменений представлен на рис. 1-85 Д.

Рис. 1-85. Распространение пассивного электротонического потенциала на примере немиелинизированного волокна.

А - аксон в состоянии покоя. Потенциалуправляемые Na^+ -каналы (показаны розовым цветом) находятся в состоянии покоя, потенциалуправляемые K^+ -каналы (показаны желтым цветом) находятся в состоянии инактивации, работают только каналы утечки (показаны коричневым цветом), через которые осуществляется выход ионов K^+ во внешнюю среду. Б - аксон представляет собой цилиндр («электрический кабель»), который заполнен электролитом. Электрические свойства аксона можно моделировать, используя радиоэлектронные элементы: R_m - сопротивление мембраны, C_m - емкость мембраны, r_{in} - сопротивление цитоплазмы, r_{out} - сопротивление жидкости внешней среды. Мембрана немиелинизированного нервного волокна напрямую контактирует с внешней средой, и таким образом в покое обмен ионами между внутри- и внеклеточной средами (ионные токи через плазматическую мембрану, прежде всего по каналам утечки) может происходить в любой точке немиелинизированного нервного волокна. В - через стимулирующий электрод подается подпороговый импульс электрического тока, который распространяется электротонически по аксону. Г - изменения мембранного потенциала измеряются регистрирующими электродами у основания аксона (V_1) и в различных точках вдоль него (V_2, V_3, V_4, V_5, V_6). В аксоне ток вызывает деполяризацию величиной 10 мВ и сдвигает мембранный потенциал с -65 до -55 мВ (V_1). На расстоянии 1 см (V_2) это изменение потенциала уменьшается на 63%, достигая 37% своего исходного значения (3,7 мВ). Это расстояние (1 см) называют постоянной длины мембраны аксона. Д - график изменения пассивного электротонического потенциала в зависимости от длины аксона



Распространение потенциала действия

Распространение возбуждения в форме потенциала действия принципиально отличается от распространения пассивного электротонического потенциала. Ни амплитуда, ни форма потенциала действия при его распространении по нервному волокну не меняются. Это обусловлено тем, что при пороговой деполяризации активируются потенциалуправляемые ионные каналы, чего не происходит при распространении пассивного электротонического потенциала. Благодаря специфическим свойствам каналов утечки и Na^+ и K^+ потенциалуправляемых каналов форма потенциала действия поддерживается неизменной.

На рисунке 1-86 А представлена схема немиелинизированного волокна, для удобства обсуждения механизма распространения потенциала действия разбитая на фрагменты, каждый из которых включает один потенциалуправляемый Na^+ -канал (показан розовым цветом), находящийся в состоянии покоя, один потенциалуправляемый K^+ -канал (показан желтым цветом), находящийся в состоянии инактивации, и один канал утечки (показан коричневым цветом), через который осуществляется выход ионов K^+ во внешнюю среду.

Для понимания механизмов распространения потенциала действия необходимо учитывать как пассивные (емкость и сопротивление), так и активные (активация потенциалуправляемых каналов) свойства мембраны нервного волокна. Рассмотрим эквивалентную электрическую схему (рис. 1-86 Б), представляющую собой электрическую модель нервного волокна, удобную для рассматривания проведения потенциала действия. Сопротивлением аксоплазмы и наружной среды можно в определенном смысле пренебречь. На этой схеме представлен лишь один элемент мембраны.

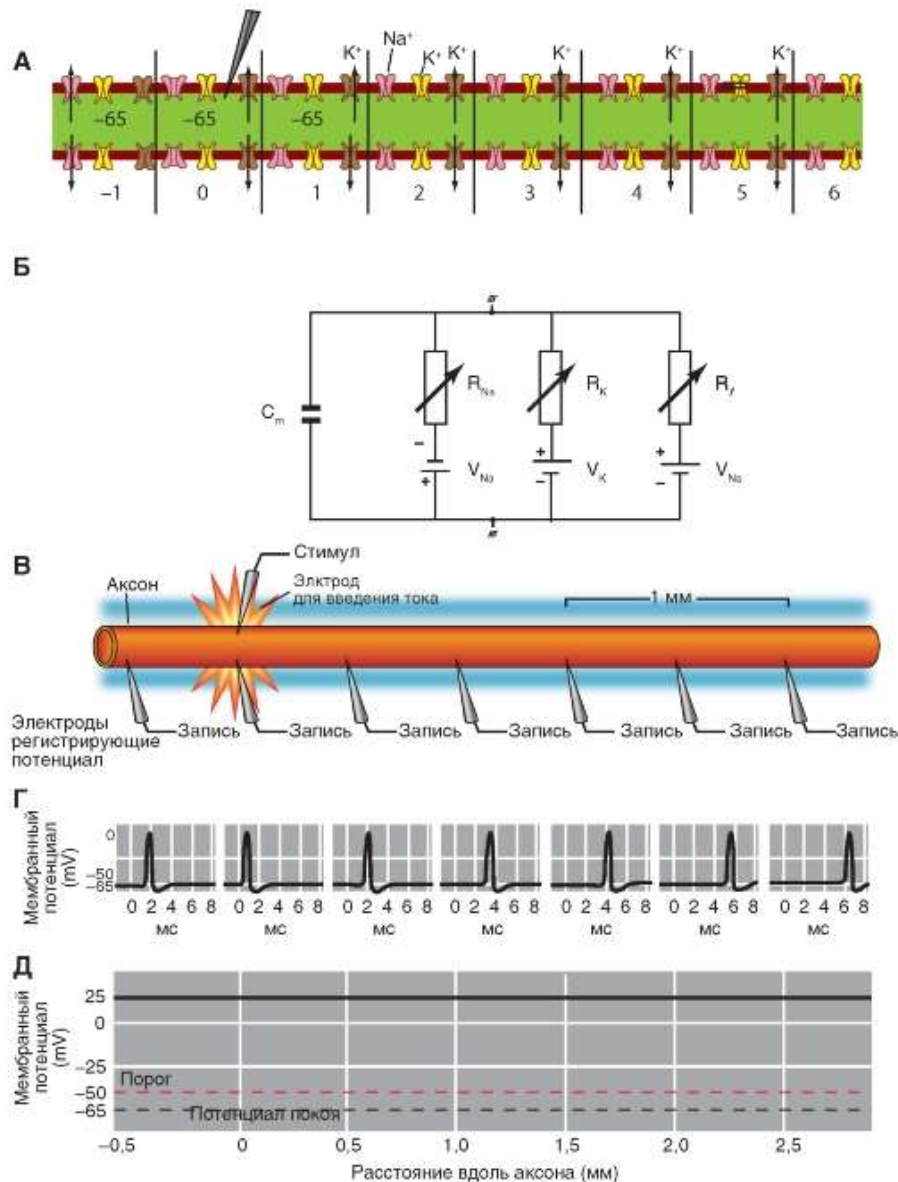
Каждый элемент имеет емкость мембраны C_m (рис. 1-86 Б), сопротивление потенциалуправляемого Na^+ -канала (R_{Na}), натриевую батарею V_{Na} , сопротивление потенциалуправляемого K^+ -канала (R_{K}), калиевую батарею, сопротивление канала утечки, K_2P -канала (R_1), батарею канала утечки V_1 . Сопротивление канала утечки и его батарея приведены для демонстрации движения ионов по круговым локальным токам через эти каналы в невозбужденных участках мембраны аксона, соседствующих с возбужденным.

Пространственное распределение потенциала по мембране определяется токами, протекающими через нее. Однако при распространении потенциала действия по аксону ток зависит от координаты (эта пространственная неоднородность зависит, например, от наличия открытых потенциалуправляемых каналов). Именно поэтому локальное изменение потенциала (его первая производная) определяется локальными токами (т.е. ток как функция координаты). В свою очередь, локальный ток через мембрану определяется локальным потенциалом, и изменение тока (его первая производная) зависит как от пространственного изменения потенциала (резистивный компонент), так и от временного изменения потенциала (емкостной компонент).

На рисунке 1-86 В показан аксон с введенным в него стимулирующим электродом и группой регистрирующих микроэлектродов. Потенциалы действия в каждой регистрируемой точке показаны на рис. 1-86 Г и измеряются регистрирующими электродами у основания аксона (V_1), а также в различных точках вдоль него (V_2 , V_3 , V_4 , V_5 , V_6); график этих изменений представлен на рис. 1-86 Д. Уже из этих последних рисунков видно, что при распространении потенциала действия по аксону ни его амплитуда, ни его форма не меняются. Механизм явления представлен на следующем рисунке.

Рис. 1-86. Распространение потенциала действия на примере немиелинизированного волокна.

А - аксон в состоянии покоя. Потенциалуправляемые Na^+ -каналы (показаны розовым цветом) находятся в состоянии покоя, потенциалуправляемые K^+ -каналы (показаны желтым цветом) находятся в состоянии инактивации, работают только каналы утечки (показаны коричневым цветом), через которые осуществляется выход ионов K^+ во внешнюю среду. Б - электрические свойства аксона можно моделировать, используя радиоэлектронные элементы. Показана эквивалентная электрическая схема одного фрагмента мембраны аксона, где C_m - емкость мембраны, R_{Na} - сопротивление потенциалуправляемого Na^+ -канала, V_{Na} - натриевая батарея, R_{K} - сопротивление потенциалуправляемого K^+ -канала, V_{K} - калиевая батарея, R_l - сопротивление канала утечки ($\text{K}_{2\text{P}}$ -канала), V_l - батарея канала утечки. Мембрана немиелинизированного нервного волокна напрямую контактирует с внешней средой и, таким образом, в покое обмен ионами между внутри- и внеклеточной средами (ионные токи через плазматическую мембрану, прежде всего по каналам утечки) может происходить в любой точке немиелинизированного нервного волокна. В - через стимулирующий электрод подается пороговый импульс электрического тока, вызывающий возникновение потенциала действия. Г - потенциал действия распространяется по волокну без затухания и измеряется регистрирующими электродами у основания аксона (V_1), а также в различных точках вдоль него (V_2, V_3, V_4, V_5, V_6). Д - график, демонстрирующий неизменную амплитуду потенциала действия на любом удалении от точки стимуляции

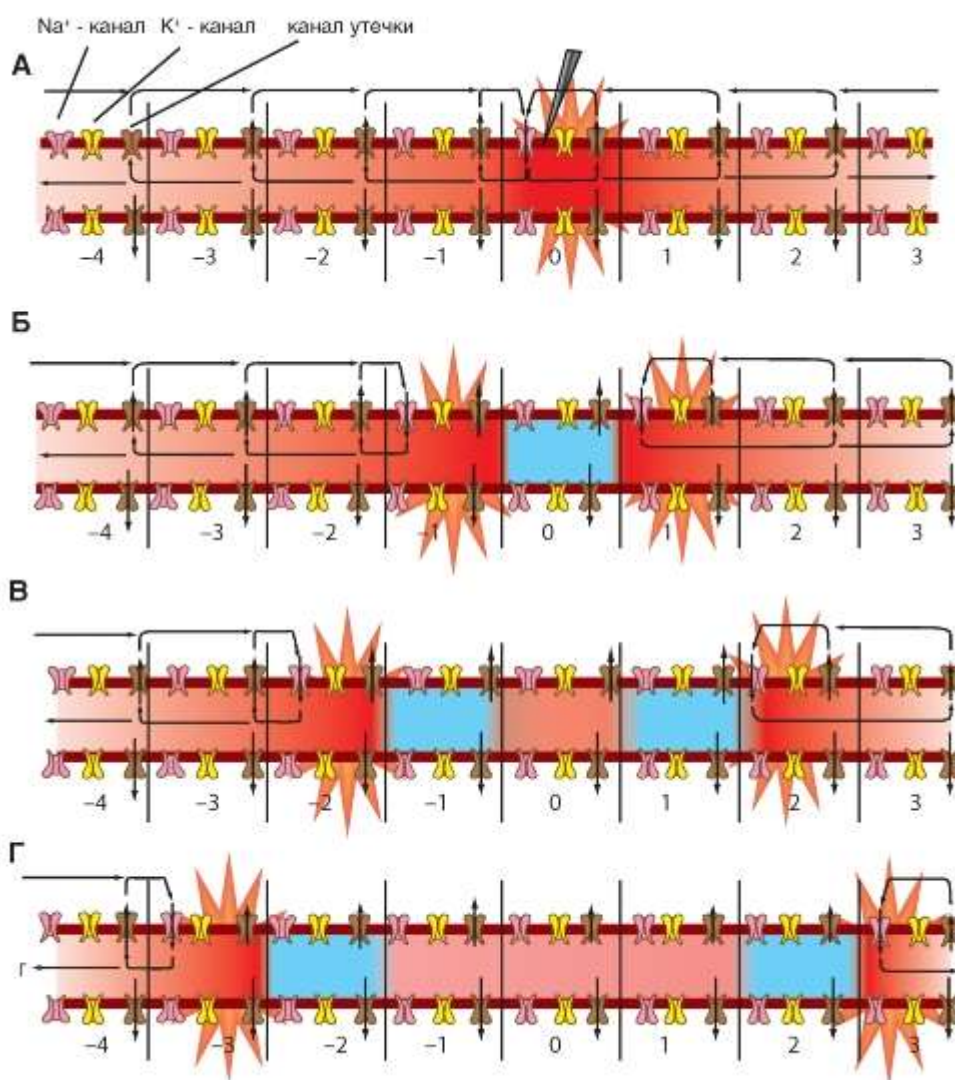


Механизм распространения потенциала действия по немиелинизированному волокну

Рис. 1-87. Механизм проведения потенциала действия в немиелинизированном волокне.

А - схема немиелинизированного нервного волокна в покое. Для описания механизма проведения возбуждения по немиелинизированному нервному волокну аксон разбит на условные фрагменты 0, 1, 2, 3...n, каждый из которых содержит потенциалуправляемые Na^+ - и K^+ -каналы и каналы утечки. Зеленый цвет всех фрагментов аксона соответствует состоянию покоя (рис. 1-86 А). А - раздражение фрагмента (0) нервного волокна приводит к открытию потенциалуправляемых Na^+ -ионных каналов, что ведет к возникновению входящего Na^+ -тока (фрагмент волокна окрашен красным цветом) и генерации фазы деполяризации потенциала действия на этом участке аксона. Поскольку внутриклеточная среда служит проводником, входящий в зону (0) ток распространяется в обе стороны от возбужденного участка. Так как мембрана нервного волокна не идеальный изолятор, распространяющиеся токи будут покидать волокно через единственно открытые каналы утечки, т.е. возникнут выходящие токи, протекающие через соседние участки мембраны (зоны 1, а также зоны 2, 3 и т.д.). Таким образом, локальный входящий ток всегда вызывает выходящие токи в прилегающих невозбужденных участках, т.е. возникают локальные круговые токи между возбужденным и прилегающими невозбужденными участками. Линии показывают локальные круги тока, текущего между деполяризованной и недеполяризованной областями внутри и снаружи аксона и через зоны мембраны, находящиеся в покое (зоны 1), а также на большем удалении. Б - токи, протекающие через зоны (1), электротонически изменяют их потенциал, приводя к разряду мембранной емкости и, следовательно, к деполяризации. Важно отметить, что эта фаза распространения потенциала действия опосредована пассивными свойствами мембраны нервного волокна (аналогично распространению пассивного электротонического потенциала). Однако в отличие от пассивного электротонического потенциала, деполяризация, возникающая в зонах (1), при распространении потенциала действия достигает порога открывания потенциалуправляемых Na^+ -каналов. Это приводит к лавинообразному открытию всех Na^+ -каналов в зонах (1), что сопровождается возникновением фазы деполяризации потенциала действия в этих зонах волокна. Входящий Na^+ -ток вызывает локальные круговые токи между возбужденными зонами (1) и прилегающими участками - невозбужденными зонами (2), а также зоной 0. Несмотря на то что в результате этого процесса зона (0) также частично деполяризуется, потенциалуправляемые Na^+ -каналы в ней находятся в состоянии инактивации, а вся зона - в состоянии рефрактерности (голубой цвет на рисунке). Именно поэтому здесь потенциал действия вновь не возникнет. В зонах (2), находящихся в состоянии покоя, локальные круговые токи электротонически сдвигают потенциал покоя в сторону деполяризации. Когда деполяризация достигает уровня критического потенциала, активируются потенциалуправляемые Na^+ -каналы и соответственно появляется входящий Na^+ -ток, формирующий в зонах (2) фазы деполяризации потенциалов действия. В - далее входящий Na^+ -ток, протекающий через мембрану в зонах 2, вызывает локальные круговые токи между возбужденными зонами 2 и невозбужденными зонами 3, а также зонами 1 и 0. Стрелки вновь показывают локальные круги тока. Хотя в результате этого процесса зоны 1 также частично деполяризуются, потенциалуправляемые Na^+ -каналы в них находятся в состоянии инактивации. Там регистрируются фазы реполяризации потенциала действия, а сами зоны находятся в состоянии рефрактерности (голубой цвет на рисунке). Именно поэтому в зонах 1 потенциал действия не возникнет. Его также не будет в зоне 0, поскольку она удалена от центров возбуждения. Вспомним, что пассивный электротонический потенциал распространяется с затуханием. Таким образом, электротоническая деполяризация, вызванная круговыми токами между возбужденными зонами 2, а также зонами 1 и 0, не достигает порога активации потенциалуправляемых

Na^+ -каналов в зонах 1 и 0, и там потенциалы действия не возникают. В зонах 3 потенциал действия будет вызван. Г - Входящий Na^+ -ток, протекающий через мембрану в зонах 3, вызывает локальные круговые токи между возбужденными зонами 3 и невозбужденными зонами 4, а также зонами 2, 1 и 0. Стрелки вновь показывают локальные круги тока. Хотя в результате этого процесса зоны 2 также частично деполяризуются, потенциалуправляемые Na^+ -каналы в них находятся в состоянии инактивации. Там регистрируются фазы реполяризации потенциала действия, а сами зоны находятся в состоянии рефрактерности (голубой цвет на рисунке). Именно поэтому в зонах 2 потенциал действия не возникнет. Не возникнет потенциал действия и в зонах 1 и 0, поскольку они удалены от центров возбуждения. Вспомним опять, что пассивный электротонический потенциал распространяется с затуханием. Таким образом, электротоническая деполяризация, вызванная круговыми токами между зонами 3 и 2, 1, 0, не достигает порога активации потенциалуправляемых Na^+ -каналов, и потенциал действия там не возникает. В зонах 4 потенциал действия будет вызван



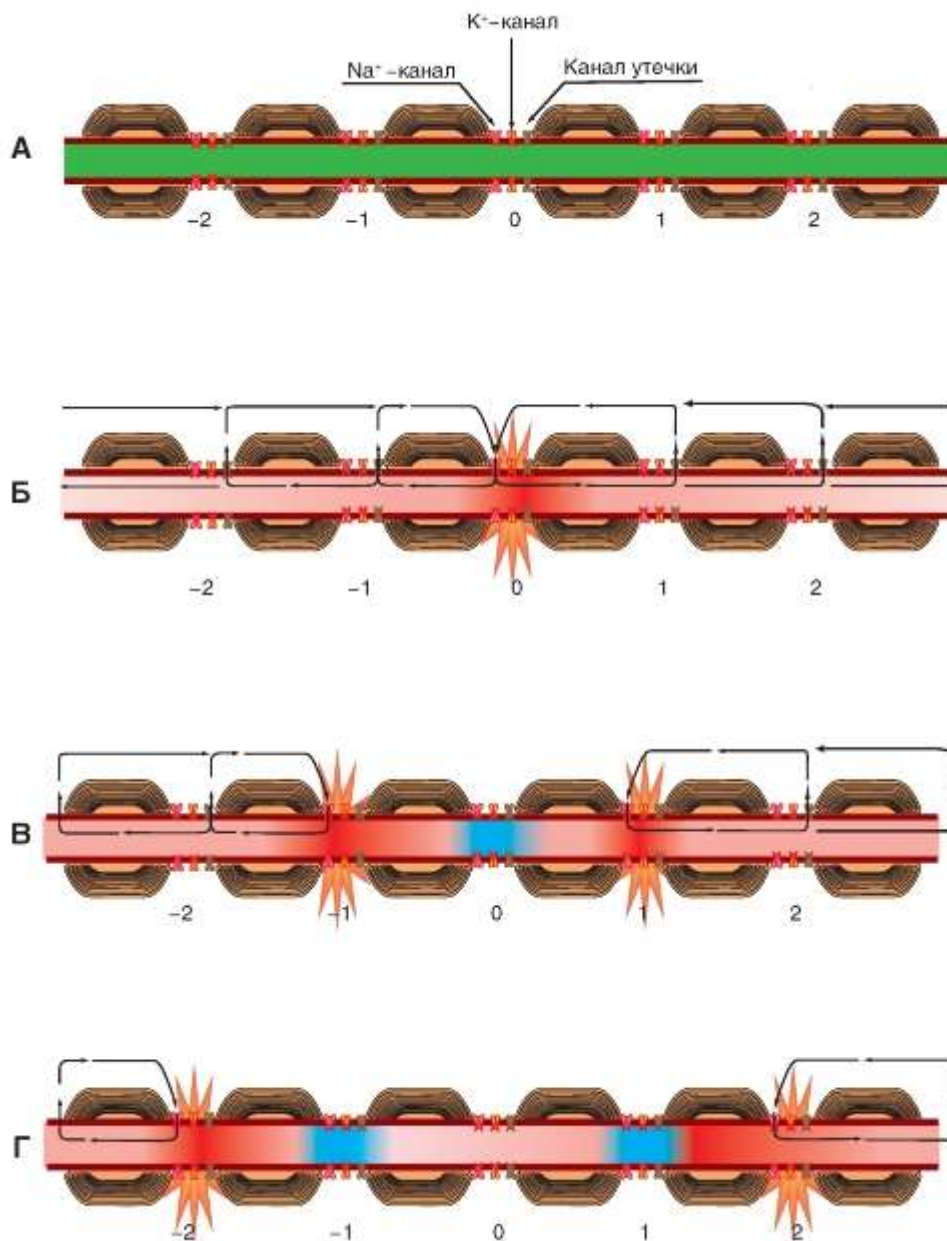
Механизм распространения потенциала действия по миелинизированному волокну

Рис. 1-88. Механизм проведения потенциала действия в миелинизированном волокне.

А - для описания механизма проведения возбуждения по миелинизированному нервному волокну аксон разбит на условные фрагменты 1, 2, 3...n, каждый из которых содержит 1 перехват Ранвье с потенциалуправляемыми Na^+ - и K^+ -каналами и каналами

утечки. Внешняя поверхность мембраны перехватов Ранвье заряжена положительно, а внутренняя поверхность их мембраны заряжена отрицательно. Остальные области мембраны покрыты миелином. Зеленый цвет всех фрагментов аксона соответствует состоянию покоя. Электрическая активность в миелинизированном аксоне возможна только в области перехватов Ранвье, где ионы могут проходить через мембрану. Эти регионы мембраны имеют большую плотность потенциалуправляемых Na^+ -каналов. Участки нервного волокна, которые покрыты миелином, имеют значительно более высокое сопротивление, чем обычная плазматическая мембрана. Таким образом, локальные круговые токи, которые необходимы для генерации потенциала действия, на миелинизированных участках не возникают. Потенциалы действия возникают только в перехватах Ранвье. Миелинизированное волокно представляет собой значительно более качественный кабель по сравнению с немиелинизированным аксоном. Как следствие, электрические сигналы будут распространяться электротонически на большие расстояния.

Б - схема состояния миелинизированного нервного волокна при действии на перехват Ранвье (0) порогового раздражителя. Вспомним, что у миелинизированных нервных волокон, вследствие высокой концентрации свободных ионов внутри и снаружи нервного волокна, внутри- и внеклеточная среды являются хорошими проводниками. Кроме того, ток может протекать через мембрану только в районах перехватов Ранвье. Раздражение перехвата Ранвье (0) нервного волокна приводит к открытию потенциалуправляемых Na^+ -ионных каналов, что ведет к возникновению входящего Na^+ -тока и генерации фазы деполяризации потенциала действия. В результате этого между возбужденным (0) и соседними перехватами Ранвье (1) и (2) возникает разность потенциалов, что вызывает локальный круговой ток, текущий между деполяризованной и недеполяризованной областями внутри аксона и замыкающегося через экстрацеллюлярную жидкость. Стрелки показывают локальный круг тока, текущего между деполяризованной и недеполяризованной областями внутри и снаружи аксона, проникая через покоящуюся зону перехвата Ранвье (1) мембраны и частично на большем удалении. В - раздражение перехватов Ранвье (1) нервного волокна приводит к открытию потенциалуправляемых Na^+ -ионных каналов, что ведет к возникновению входящего Na^+ -тока и генерации фазы деполяризации потенциалов действия на этих участках. В результате между возбужденными перехватами Ранвье (1) и между соседними перехватами Ранвье (2) возникает разность потенциалов, что вызывает локальные токи, текущие между деполяризованной и недеполяризованной областями. Такой же локальный ток течет и между перехватами Ранвье (1) и перехватом Ранвье (0), но, поскольку последний находится в стадии рефрактерности (Na-каналы находятся в состоянии инактивации и не могут быть открыты), перехват Ранвье (0) возбудиться не может. Г - раздражение перехватов Ранвье (2) нервного волокна приводит к открытию потенциалуправляемых Na^+ -ионных каналов, что ведет к возникновению входящего Na^+ -тока и генерации фазы деполяризации потенциалов действия (нижняя часть рисунка) на этих участках. В результате между возбужденными перехватами Ранвье (2) и соседними перехватами Ранвье (3) возникает разность потенциалов, что вызывает локальные токи, текущие между деполяризованной и недеполяризованной областями. Такой же локальный ток течет и между перехватами Ранвье (1) и перехватом Ранвье (0), но, поскольку перехваты Ранвье (1) находятся в стадии рефрактерности (Na-каналы находятся в состоянии инактивации и не могут быть открыты), они возбудиться не могут



Проведение возбуждения по двум типам волокон

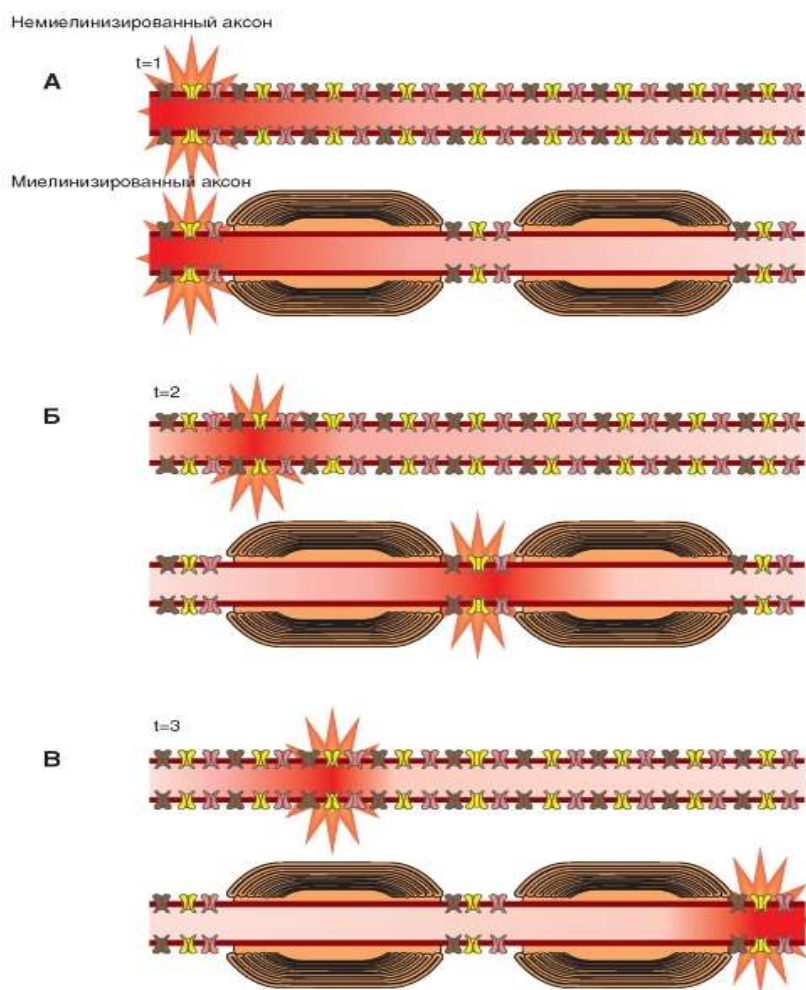
Распространение возбуждения в немиелинизированном и миелинизированном нервном волокне суммарно и схематически представлено на рис. 1-89. В отличие от немиелинизированного волокна, возбуждение передается от одного перехвата Ранвье к другому, и потенциалы действия возникают только в этих зонах. То есть происходит «перескакивание» возбуждения от одного перехвата Ранвье к другому. Такой механизм, характерный только для миелинизированных нервных волокон, называется сальтаторным проведением. Электрический ток течет через окружающую экстрацеллюлярную жидкость снаружи миелинового покрытия, так же как и через аксоплазму аксона от перехвата к перехвату, успешно возбуждая перехваты один за другим. Таким образом, нервный импульс «прыгает» по волокну, обуславливая наличие такого термина как «сальтаторное проведение». Пусть возбуждение возникло одновременно на двух типах волокон (рис. 1-89 А). Благодаря сальтаторному проведению у миелиновых волокон потенциал действия возникает сразу же на расстоянии в следующем перехвате Ранвье, тогда как в немиелинизированном волокне потенциал действия возникает только на соседнем участке

(рис. 1-89 Б). Далее у миелиновых волокон потенциал действия возникает на следующем перехвате Ранвье, тогда как в немиелинизированном волокне потенциал действия возникает только на следующем участке (рис. 1-89 В).

Сальтаторное проведение ценно по двум причинам. Во-первых, вызывая деполяризацию только перехватов Ранвье, возбуждение «прыгает» вдоль длинных участков оси нервного волокна, и этот механизм увеличивает скорость проведения возбуждения примерно в 5-50 раз. Во-вторых, сальтаторное проведение консервирует энергию у аксона, потому что деполяризуются только перехваты, позволяя при генерации потенциалов действия терять в 100 раз меньше ионов и, таким образом, требуя минимального метаболизма для восстановления натриевой и калиевой разностей концентраций относительно мембраны после серии нервных импульсов.

Другая любопытная черта сальтаторного проведения в больших миелиновых волокнах заключается в следующем. В конце потенциала действия, когда потенциалуправляемые Na^+ -каналы инактивируются, реполяризация развивается так быстро, что многие из K^+ -каналов даже не успевают открыться. Таким образом, проведение нервного импульса в миелинизированных волокнах опосредовано в основном ионной проводимостью через потенциалуправляемые Na^+ -каналы и каналы утечки. Вклад потенциалуправляемых K^+ -каналов незначителен. Этим объясняется тот факт, что потенциалы действия миелинизированных нервных волокон часто не имеют фазы следовой гиперполяризации.

Рис. 1-89. Сравнение общих принципов проведения возбуждения по немиелинизированному и миелинизированному нервному волокну



Внеклеточные потенциалы

В качестве предварительного усилителя обычно применяют усилитель постоянного тока с дифференциальным входом (рис. 1-90 А). Это связано с тем, что измеряется разность потенциалов между возбужденными и невозбужденными участками нерва.

Далее (рис. 1-90 Б) показаны записи внеклеточного потенциала нервного волокна на примере ответов седалищного нерва лягушки. Потенциал действия нерва во многом отличается от потенциала действия отдельных волокон. Он не подчиняется закону «все или ничего», поскольку при увеличении силы раздражающего импульса увеличивается число возбужденных аксонов и, следовательно, растет суммарная амплитуда самого потенциала действия. Сложный потенциал действия нерва отличается также своими порогом, формой и рядом других характеристик.

По скорости проведения возбуждения, длительности различных фаз потенциала действия и строению нервные волокна принято выделять три основных типа, обозначаемых буквами А, В и С (рис. 1-90 В).

Волокна типа А делятся на четыре подгруппы. Это α , β , γ и δ . Все они покрыты миелиновой оболочкой. Наиболее толстые из них, так называемые альфа-волокна (αA), у теплокровных животных и человека имеют диаметр 12-22 μm и характеризуются значительной скоростью проведения возбуждения: 70-120 м/с. Такие волокна проводят возбуждение от моторных нервных центров спинного мозга к скелетным мышцам и от рецепторов мышц к соответствующим нервным центрам. Пик потенциала действия αA волокон у теплокровных длится 0,4-0,5 мс. После его окончания развивается следовая деполяризация, которая продолжается 15-20 мс и переходит в следовую гиперполяризацию длительностью около 40-60 мс.

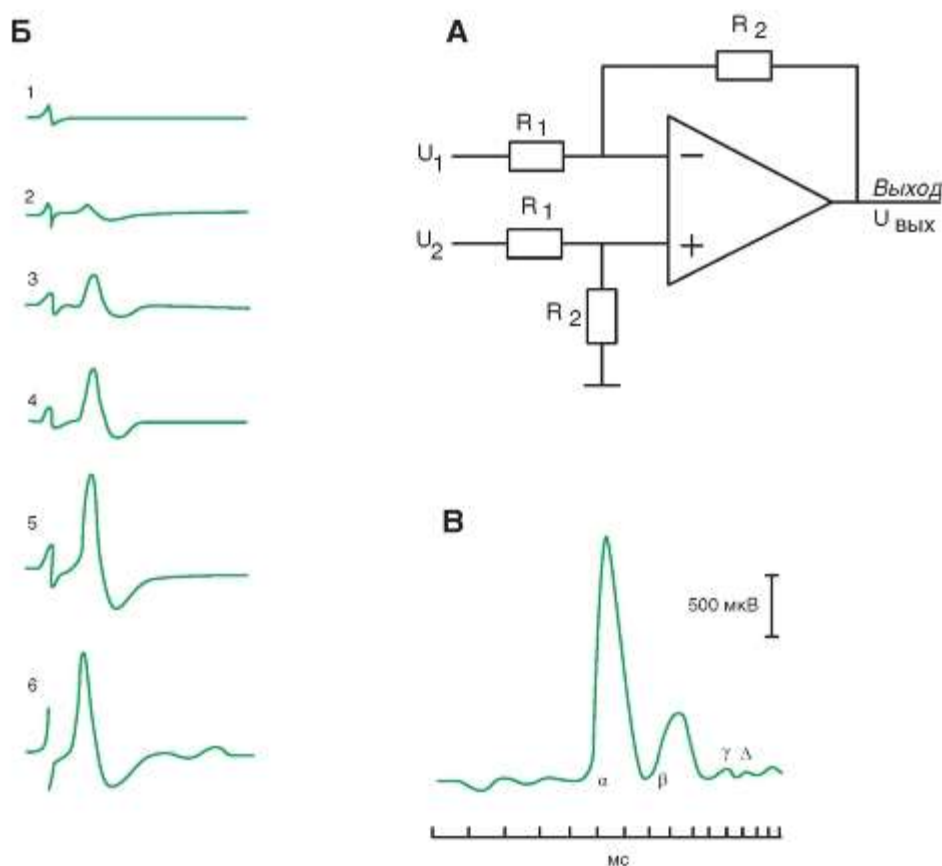
Три другие группы волокон типа А (β , γ и δ) имеют меньший диаметр, меньшую скорость проведения и более длительный потенциал действия. Это преимущественно чувствительные волокна, проводящие возбуждение от различных рецепторов в центральную нервную систему. Исключение составляют γA -волокна, значительная часть которых проводит возбуждение от клеток спинного мозга к так называемым интрафузальным мышечным волокнам, входящим в состав рецепторов мышц - мышечных веретен (см. раздел «Мышцы»).

К волокнам типа В относят миелинизированные, преимущественно преганглионарные, волокна автономной нервной системы. Скорость проведения возбуждения в этих волокнах у теплокровных животных составляет 3-18 м/с. Продолжительность потенциала действия волокон типа В примерно в 3 раза превышает длительность потенциала действия волокон типа А (она составляет 1-2 мс). Отличительная особенность этих волокон состоит в том, что в них не обнаруживается фаза следовой деполяризации, - нисходящее колено пика непосредственно переходит в следовую гиперполяризацию, которая в ряде случаев продолжается свыше 100 мс.

К волокнам типа С относят немиелинизированные нервные волокна очень малого диаметра (порядка 1 μm). Скорость проведения возбуждения в этих волокнах не более 3 м/с. Большинство С-волокон относится к постганглионарным волокнам симпатической нервной системы. К С-волокам относят также нервные волокна, участвующие в проведении возбуждения от болевых рецепторов и некоторых рецепторов холода, тепла и давления. Потенциалы действия С-волокон характеризуются наибольшей продолжительностью (2 мс у теплокровных животных). Они имеют длительную фазу следовой деполяризации (50-80 мс), сопровождающуюся еще более продолжительной (300-1000 мс) следовой гиперполяризацией.

Рис. 1-90. Потенциалы нервного волокна и их регистрация.

А - дифференциальный усилитель для внеклеточной регистрации потенциалов нервного волокна. Б - записи внеклеточного потенциала нервного волокна на примере ответов седалищного нерва лягушки на электрические стимулы возрастающей силы. Показаны момент артефакта стимуляции и момент возбуждения нервных волокон. На фрагментах регистрации 5 и 6 видно, что, несмотря на двукратное увеличение амплитуды стимула, значение амплитуды возникающего возбуждения не изменяется. В - суммарный внеклеточный потенциал смешанного нервного волокна; α , β , γ , δ - потенциалы разных типов нервных волокон



Законы проведения возбуждения

Существует несколько необходимых условий проведения возбуждения по нерву, названных «законами» проведения возбуждения по нервному волокну.

Первый закон заключается в том, что при раздражении нервного волокна возбуждение по нерву распространяется в обе стороны. Для доказательства этого на разные концы нервного волокна накладывают две пары электродов, связанных с двумя дифференциальными усилителями, как это показано на рис. 1-91 А. Раздражение наносят в центре, между этими электродами. В результате двустороннего проведения возбуждения регистрирующая аппаратура, связанная с усилителями, зарегистрирует прохождение импульса как под электродами усилителя (1), так и под электродами усилителя (2).

Второй закон заключается в том, что распространение возбуждения в обе стороны происходит с одинаковой скоростью. Если расстояние между электродами усилителя (1) и

раздражающими электродами равно расстоянию между электродами усилителя (2) и раздражающими электродами (рис. 1-91 А), то регистрирующая аппаратура зарегистрирует прохождение импульса как под электродами усилителя (1), так и под электродами усилителя (2) одновременно.

Третий закон заключается в том, что возбуждение по нерву распространяется без затухания или без «декремента». Для доказательства на одну сторону нервного волокна накладывают пару электродов, посредством которых наносят раздражение, а две пары электродов, связанных с двумя дифференциальными усилителями, располагают на удалении, как это показано на рис. 1-91 Б. В этом случае регистрирующая аппаратура, связанная с усилителями (1) и (2), продемонстрирует одинаковую амплитуду потенциала действия нервного волокна.

Четвертый закон заключается в том, что для проведения возбуждения по нервному стволу необходима анатомическая и физиологическая целостность нервного волокна. Проведение импульсов возможно лишь при условии анатомической целостности волокна, поэтому любая травма поверхности волокна нарушают его проводимость. Отсутствие проводимости наблюдается также при нарушении физиологической целостности волокна. В эксперименте на одну сторону нервного волокна накладывают пару электродов, посредством которых наносят раздражение, а пару электродов, связанных с дифференциальным усилителем, располагают на удалении, как это показано на рис. 1-91 В. В этом случае регистрирующая аппаратура, связанная с усилителями (1), продемонстрирует в контрольных условиях потенциал действия нервного волокна. Достичь нарушения физиологической целостности нервного волокна можно, накладывая между раздражающими и регистрирующими электродами ватку, смоченную спиртом. Если перевязать лигатурой нервный ствол, проведение возбуждения по нему наблюдаться не будет из-за нарушения его анатомической целостности.

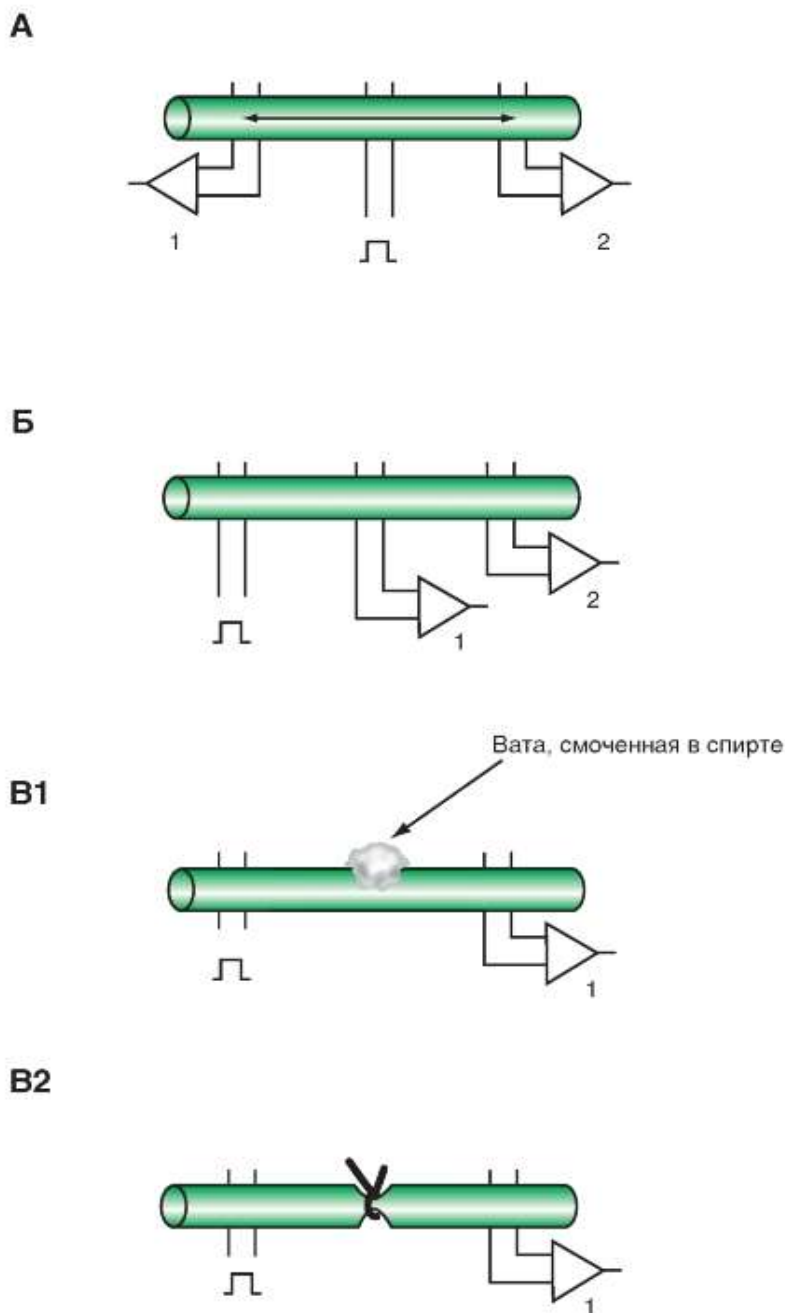
Пятый закон заключается в том, что возбуждение распространяется по нервным волокнам нервного ствола изолированно. В периферическом нерве импульсы распространяются по каждому волокну изолированно, т.е. не переходя с одного волокна на другое и оказывая действие только на те клетки, с которыми контактируют окончания данного нервного волокна. Изолированное проведение в отдельных волокнах смешанного нерва может быть доказано опытом на нервно-мышечном препарате скелетной мышцы, иннервированной смешанным нервом, в образовании которого участвует несколько спинно-мозговых корешков. Если раздражать один из этих корешков, сокращается не вся мышца, а только те группы мышечных волокон, которые иннервированы раздражаемым корешком. Более строгим доказательством изолированного проведения возбуждения служит отведение потенциалов действия от различных нервных волокон нервного ствола.

Шестой закон заключается в том, что нерв не утомляется. Это доказывается следующим экспериментом. На одну сторону нервного волокна накладывают пару электродов, посредством которых наносят раздражение, а две пары электродов, связанных с двумя дифференциальными усилителями, располагают на удалении, как это показано на рис. 1-91 Б. В этом случае регистрирующая аппаратура, связанная с усилителями (1) и (2), продемонстрирует одинаковую амплитуду потенциала действия нервного волокна в течение очень длительного времени.

Седьмой закон заключается в том, что в различных волокнах возбуждение распространяется с разной скоростью. Скорость проведения возбуждения зависит от сопротивления среды, окружающей волокно, от сопротивления аксоплазмы на единицу длины, сопротивления мембраны аксона и диаметра волокна. В миелинизированном волокне скорость проведения нервного импульса пропорциональна его диаметру. У немиелинизированного волокна скорость проведения возбуждения пропорциональна

квадратному корню диаметра волокна. Таким образом, скорость проведения у миелинизированного волокна значительно выше.

Рис. 1-91. Законы проведения возбуждения по нервному волокну



Глава 2. Вторичные мессенджеры

Общие представления о путях сигнальной трансдукции

Для большинства регуляторных молекул между их связыванием с мембранным рецептором и окончательной реакцией клетки, т.е. изменением ее работы, вклиниваются сложные серии событий - определенные пути передачи сигнала, иначе называемые путями сигнальной трансдукции.

Регуляторные вещества принято подразделять на эндокринные, нейрокринные и паракринные. Эндокринные регуляторы (гормоны) выделяются эндокринными клетками в кровь и переносятся ею к клеткам-мишеням, которые могут находиться в любом месте

организма. Нейрокринные регуляторы выделяются нейронами в непосредственной близости от клеток-мишеней. Паракринные вещества освобождаются несколько дальше от мишеней, но все же достаточно близко к ним, чтобы достичь рецепторов. Паракринные вещества секретируются одним типом клеток, а действуют на другой, однако в некоторых случаях регуляторы предназначены тем клеткам, которые их выделили, или соседним клеткам, относящимся к тому же типу. Это называется аутокринной регуляцией.

В ряде случаев последний этап сигнальной трансдукции состоит в фосфорилировании определенных эффекторных белков, что ведет к усилению или угнетению их активности, а это, в свою очередь, определяет необходимую организму клеточную реакцию. Фосфорилирование белков осуществляют протеинкиназы, а дефосфорилирование – протеинфосфатазы.

Изменения протеинкиназной активности происходят в результате связывания регуляторной молекулы (в общем случае называемой лигандом) с ее мембранным рецептором, что запускает каскады событий, некоторые из которых приведены на рисунке (рис. 2-1). Активность различных протеинкиназ регулируется рецептором не прямо, а через вторичные мессенджеры (вторичные посредники), в роли которых выступают, например, циклический АМФ (цАМФ), циклический ГМФ (цГМФ), Ca^{2+} , инозитол-1,4,5-три-фосфат (IP_3) и диацилглицерол (DAG). При этом связывание лиганда с мембранным рецептором изменяет внутриклеточный уровень вторичного мессенджера, что, в свою очередь, отражается на активности протеинкиназы. Многие регуляторные молекулы влияют на клеточные процессы через пути сигнальной трансдукции с участием гетеротримерных ГТФ-связывающих белков (гетеротримерных G-белков) или мономерных ГТФ-связывающих белков (мономерных G-белков).

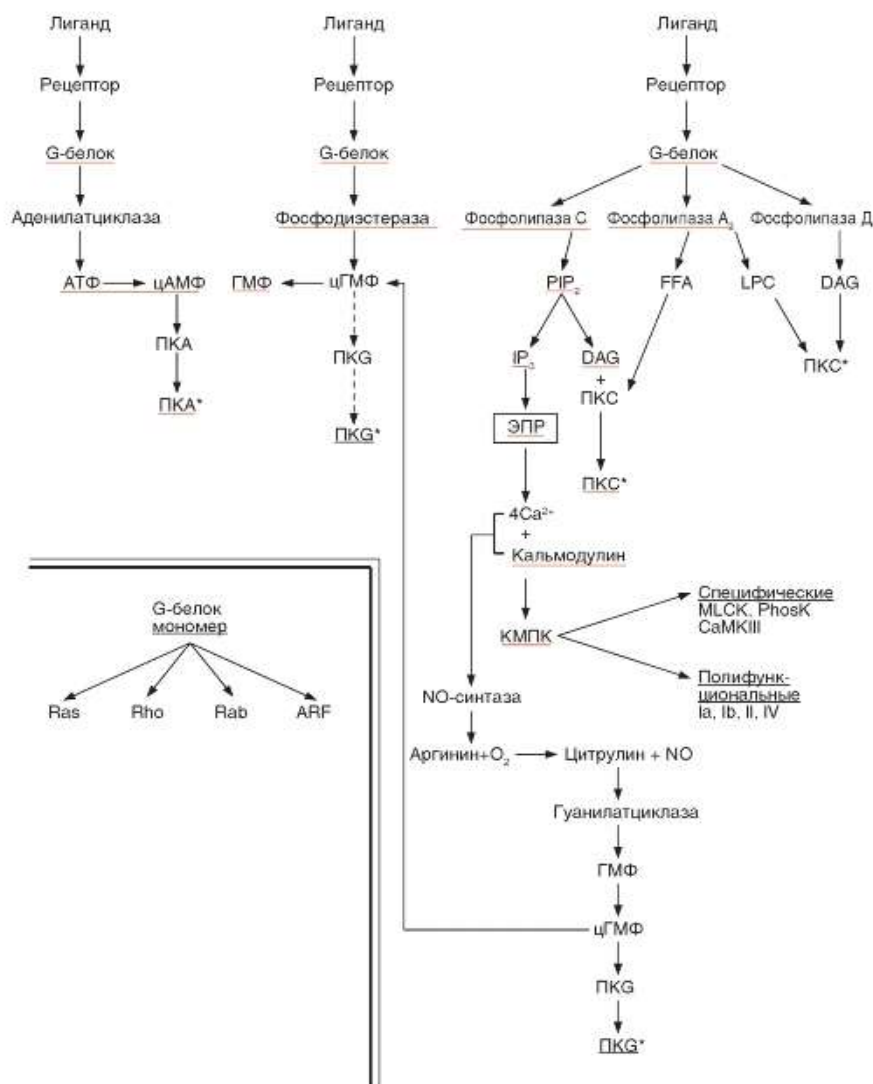
Когда молекулы лиганда связываются с мембранными рецепторами, взаимодействующими с гетеротримерными G-белками, происходит переход G-белка в активное состояние путем связывания с ГТФ. Активированный G-белок может затем взаимодействовать со многими эффекторными белками, прежде всего ферментами, такими, как аденилатциклаза, фосфодиэстераза, фосфолипазы C, A_2 и D. Это взаимодействие запускает цепи реакций (рис. 2-1), которые заканчиваются активацией различных протеинкиназ, таких, как протеинкиназа A (ПКА), протеинкиназа G (ПКГ), протеинкиназа C (ПКС).

В общих чертах пути сигнальной трансдукции с участием G-белков – протеинкиназ включает следующие этапы.

1. Лиганд связывается с рецептором на мембране клетки.
2. Связанный с лигандом рецептор, взаимодействуя с G-белком, активирует его, и активированный G-белок связывает ГТФ.
3. Активированный G-белок взаимодействует с одним или несколькими следующими соединениями: аденилатциклазой, фосфодиэстеразой, фосфолипазами C, A_2 , D, активируя или ингибируя их.
4. Внутриклеточный уровень одного или нескольких вторичных мессенджеров, таких, как цАМФ, цГМФ, Ca^{2+} , IP_3 или DAG, возрастает или снижается.
5. Увеличение или уменьшение концентрации вторичного мессенджера влияет на активность одной или нескольких зависимых от него протеинкиназ, таких, как цАМФ-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа A), цГМФ-зависимая протеинкиназа (ПКГ), кальмодулинзависимая протеинкиназа (КМПК), протеинкиназа C. Изменение концентрации вторичного мессенджера может активировать тот или иной ионный канал.
6. Уровень фосфорилирования фермента или ионного канала изменяется, что влияет на активность ионного канала, обуславливая конечный ответ клетки.

Рис. 2-1. Некоторые каскады событий, реализующиеся в клетке благодаря вторичным посредникам.

Обозначения: * - активированный фермент



Мембранные рецепторы, связанные с G-белками

Мембранные рецепторы, опосредующие агонист-зависимую активацию G-белков, составляют особое семейство белков, в котором 500 с лишним представителей. К нему относятся α - и β -адренергические, мускариновые ацетилхолиновые, серотониновые, аденозиновые, обонятельные рецепторы, родопсин, а также рецепторы большинства пептидных гормонов. Представители семейства рецепторов, связанных с G-белками, имеют семь трансмембранных α -спиралей (рис. 2-2 А), каждая из которых содержит 22-28 преимущественно гидрофобных аминокислотных остатков.

Для некоторых лигандов, например, ацетилхолина, адреналина, норадреналина и серотонина, известны разные подтипы связанных с G-белками рецепторов. Зачастую они различаются сродством к конкурентным агонистам и антагонистам.

Далее представлена (рис. 2-2 Б) молекулярная организация аденилатциклазы - фермента, продуцирующего цАМФ (первый открытый вторичный мессенджер). Регуляторный путь аденилатциклазы считается классическим путем сигнальной трансдукции, обусловленной G-белками.

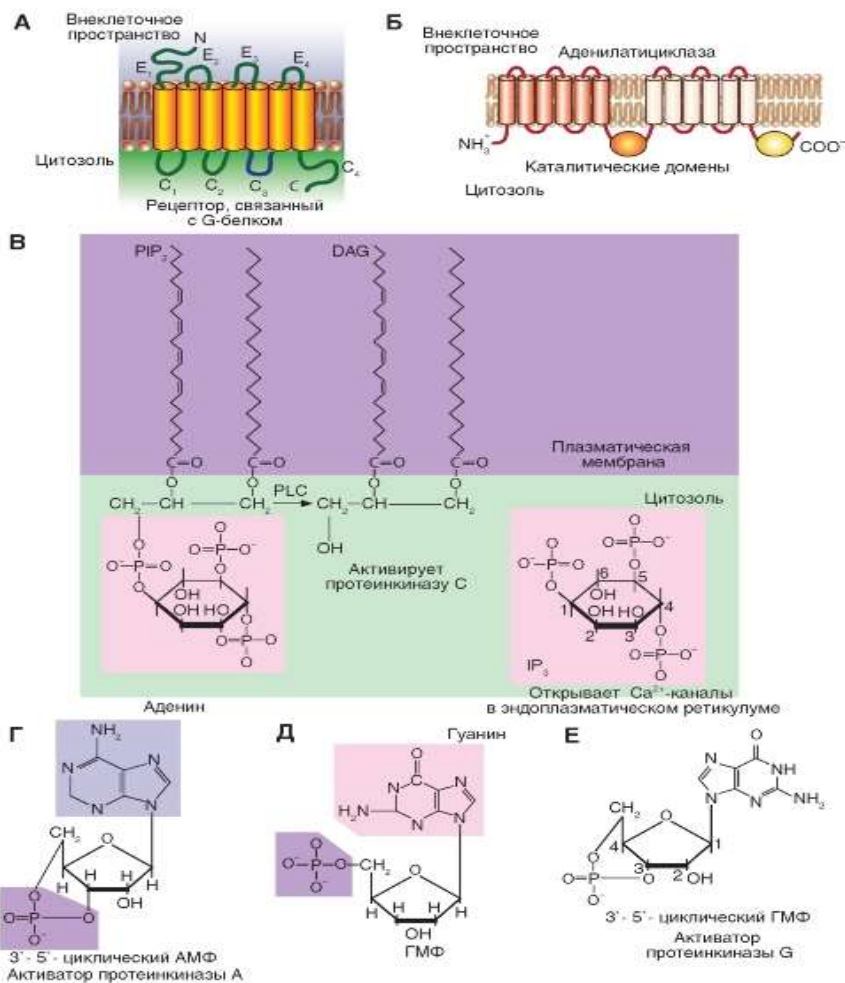
Аденилатциклаза служит основой позитивного или негативного контроля путей сигнальной трансдукции через G-белки. При позитивном контроле связывание стимулирующего лиганда, например, адреналина, действующего через β -адренергические рецепторы, ведет к активации гетеротримерных G-белков с α -субъединицей типа α_s («s» означает стимуляцию). Активация Gs-типа G-белков посредством связанного с лигандом рецептора приводит к тому, что его α -субъединица связывает ГТФ, и затем диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера.

На рисунке 2-2 В показано, как фосфолипаза C расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на инозитол-1,4,5-трифосфат и диацилглицерол. Оба вещества, инозитол-1,4,5-трифосфат и диацилглицерол, относятся к вторичным мессенджерам. IP₃, связываясь со специфическими лигандзависимыми Ca^{2+} -каналами эндоплазматического ретикулума, высвобождает из него Ca^{2+} , т.е. повышает концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. Диацилглицерол вместе с Ca^{2+} активирует другой важный класс протеинкиназ - протеинкиназу C.

Затем показана структура некоторых вторичных мессенджеров (рис. 2-2 Г-Е): цАМФ, ГМФ, цГМФ.

Рис. 2-2. Примеры молекулярной организации некоторых структур, участвующих в путях сигнальной трансдукции.

А - рецептор мембраны клетки, связывающий на внешней поверхности лиганд, а внутри - гетеротримерный G-белок. Б - молекулярная организация аденилатциклазы. В - структура фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата и образованных под действием фосфолипазы C инозитол-1,4,5-трифосфата и диацилглицерола. Г - структура 3',5'-циклического АМФ (активатора протеинкиназы А). Д - структура ГМФ. Е - структура 3',5'-циклического ГМФ (активатора протеинкиназы G)



Гетеротримерные G-белки

Гетеротримерный G-белок состоит из трех субъединиц: α (40 000-45 000 Да), β (около 37 000 Да) и γ (8000-10 000 Да). Сейчас известно около 20 различных генов, кодирующих эти субъединицы, в том числе не менее четырех генов β -субъединиц и примерно семь генов γ -субъединиц млекопитающих. Функция и специфичность G-белка обычно, хотя и не всегда, определяются его α -субъединицей. У большинства G-белков субъединицы β и γ плотно связаны между собой. Некоторые гетеротримерные G-белки и пути трансдукции, в которых они задействованы, перечислены в табл. 2-1.

Гетеротримерные G-белки служат посредниками между рецепторами плазматической мембраны для более 100 внеклеточных регуляторных веществ и внутриклеточными процессами, которые они контролируют. В общих чертах, связывание регуляторного вещества с его рецептором активирует G-белок, а тот либо активирует, либо ингибирует фермент и/или вызывает цепь событий, приводящих к активации определенных ионных каналов.

На рис. 2-3 представлен общий принцип работы гетеротримерных G-белков. В большинстве G-белков α -субъединица представляет собой «рабочий элемент» гетеротримерных G-белков. Активация большинства G-белков приводит к конформационному изменению этой субъединицы. Неактивные G-белки существуют главным образом в форме $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримеров, с ГДФ в позициях, связывающих нуклеотид. Взаимодействие гетеротримерных G-белков с присоединившим лиганд рецептором ведет к преобразованию α -субъединицы в активную форму с повышенным сродством к ГТФ и пониженной афинностью его к $\beta\gamma$ -комплексу. В результате активированная α -субъединица освобождает ГДФ, присоединяет ГТФ, а затем диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера. У большинства G-белков диссоциированная α -субъединица затем взаимодействует с эффекторными белками в пути сигнальной трансдукции. Однако у некоторых G-белков освободившийся $\beta\gamma$ -димер может быть ответственным за все или некоторые эффекты рецептор-лигандного комплекса.

Работа некоторых ионных каналов модулируется G-белками непосредственно, т.е. без участия вторичных мессенджеров. Например, связывание ацетилхолина с мускариновыми M_2 -рецепторами сердца и некоторых нейронов ведет к активации особого класса K^+ -каналов. В этом случае связывание ацетилхолина с мускариновым рецептором ведет к активации G-белка. Его активированная α -субъединица затем отделяется от $\beta\gamma$ -димера, а $\beta\gamma$ -димер напрямую взаимодействует с особым классом K^+ -каналов, приводя их в открытое состояние. Связывание ацетилхолина с мускариновыми рецепторами, повышающее K^+ -проводимость пейсмекерных клеток в синоатриальном узле сердца - один из главных механизмов, посредством которого парасимпатические нервы вызывают уменьшение частоты сердечных сокращений.

Рис. 2-3. Принцип работы гетеротримерных ГТФ-связывающих белков (гетеротримерных G-белков).

Обозначения: R - рецептор, L - лиганд, E - эффекторный белок

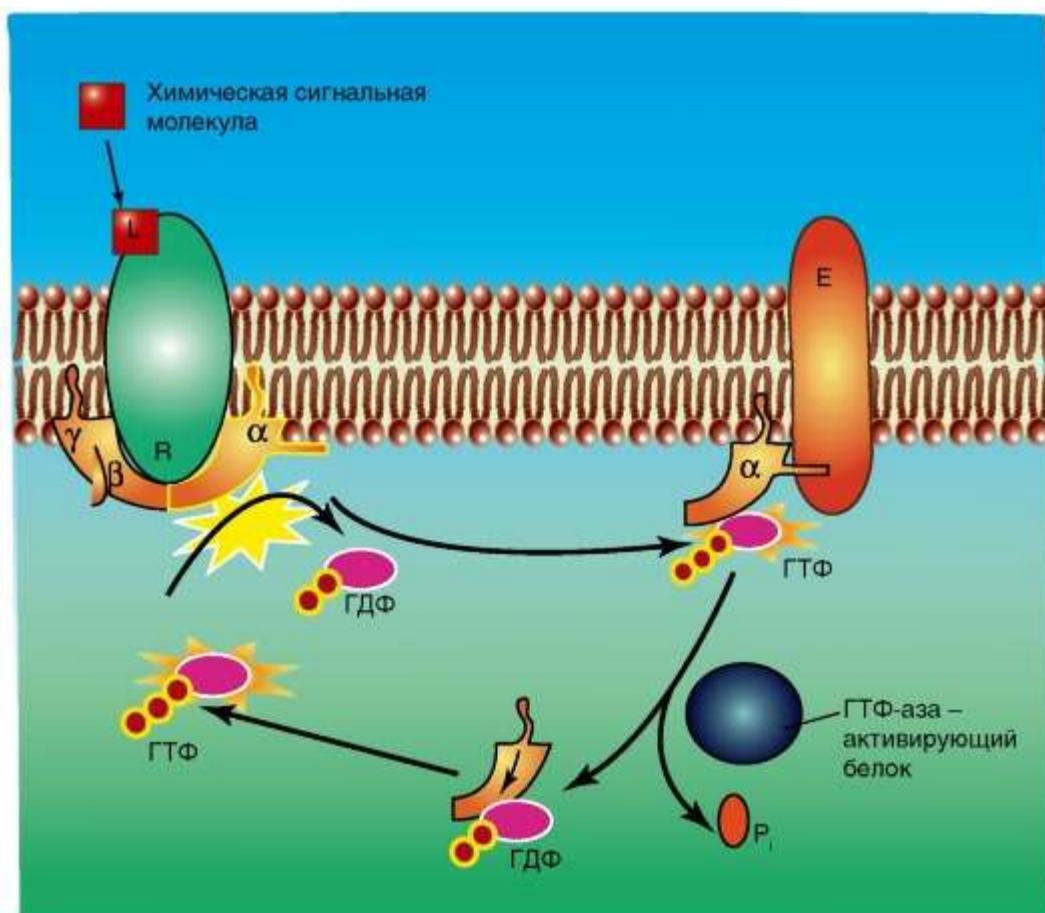


Таблица 2-1. Некоторые гетеротримерные ГТФ-связывающие белки млекопитающих, классифицированные на основе их α -субъединиц *

G-белок	Активирующие рецепторы для	Эффекторы	Сигнальные пути
G_s	Адреналин, норадреналин, гистамин, глюкоагон, адренокортикотропного, лютеинизирующего, фолликулестимулирующего, тиреотропного гормонов и др.	Аденлатниклаза Ca^{2+} -каналы	\uparrow цАМФ \uparrow вход в клетку Ca^{2+}
G_{olf} G_{cl} (палочки)	Пахучие вещества Фотоны	Аденлатниклаза пГМФ-фосфолистераза	\uparrow цАМФ (обоняние) \downarrow пГМФ (зрение)
G_{t2} (колбочки)	Фотоны	пГМФ-фосфолистераза	\downarrow пГМФ (цветовое зрение)
G_{11} , G_{12} , G_{13}	Норадреналин, простагландин, опиоиды, ангиотензин, многие пептиды	Аденлатниклаза Фосфолипаза C Фосфолипаза A ₂ K ⁺ -каналы	\uparrow цАМФ \uparrow Инзиталтрифосфат, диацилглицерин, Ca^{2+} Высвобождение арахидоновой кислоты Поларизация мембраны
G_q	Ацетилхолин, адреналин	Фосфолипаза C $_{\beta}$	\uparrow Инзиталтрифосфат, диацилглицерол, Ca^{2+}

* В каждом классе α -субъединиц различают несколько изоформ. Идентифицировано более 20 α -субъединиц.

Мономерные G-белки

Клетки содержат еще одно семейство ГТФсвязывающих белков, которые называют мономерными ГТФ-связывающими белками. Они также известны как G-белки с низкой молекулярной массой или малые G-белки (молекулярная масса 20 000-35 000 Да). В таблице 2-2 перечислены основные подклассы мономерных ГТФсвязывающих белков и некоторые из их свойств. Ras-подобные и Rho-подобные мономерные ГТФ-связывающие белки участвуют в пути сигнальной трансдукции на этапе передачи сигнала от тирозинкиназы, рецептора фактора роста, на внутриклеточные эффекторы. Среди

процессов, регулируемых путями сигнальной трансдукции, в которые вовлечены мономерные ГТФсвязывающие белки, можно назвать элонгацию полипептидной цепи в ходе белкового синтеза, пролиферацию и дифференцировку клеток, их злокачественное перерождение, контроль актинового цитоскелета, связь между цитоскелетом и внеклеточным матриксом, транспорт везикул между различными органеллами и экзоцитозную секрецию.

Мономерные ГТФ-связывающие белки, как и их гетеротримерные аналоги, представляют собой молекулярные переключатели, существующие в двух формах - активированной «включенной» и инактивированной «выключенной» (рис. 2-4 Б). Однако активация и инактивация мономерных ГТФ-связывающих белков требует дополнительных регуляторных белков, которые, насколько известно, не требуются для работы гетеротримерных G-белков. Мономерные G-белки активируются гуанин-нуклеотид-освобождающими белками, а инактивируются ГТФаза-активирующими белками. Таким образом, активация и инактивация мономерных ГТФ-связывающих белков контролируется сигналами, которые изменяют активность гуанин-нуклеотид-освобождающих белков или ГТФаза-активирующих белков скорее, чем путем прямого воздействия на мономерные G-белки.

Рис. 2-4. Принцип работы мономерных ГТФ-связывающих белков (мономерных G-белков).

Обозначения: R - рецептор, L - лиганд

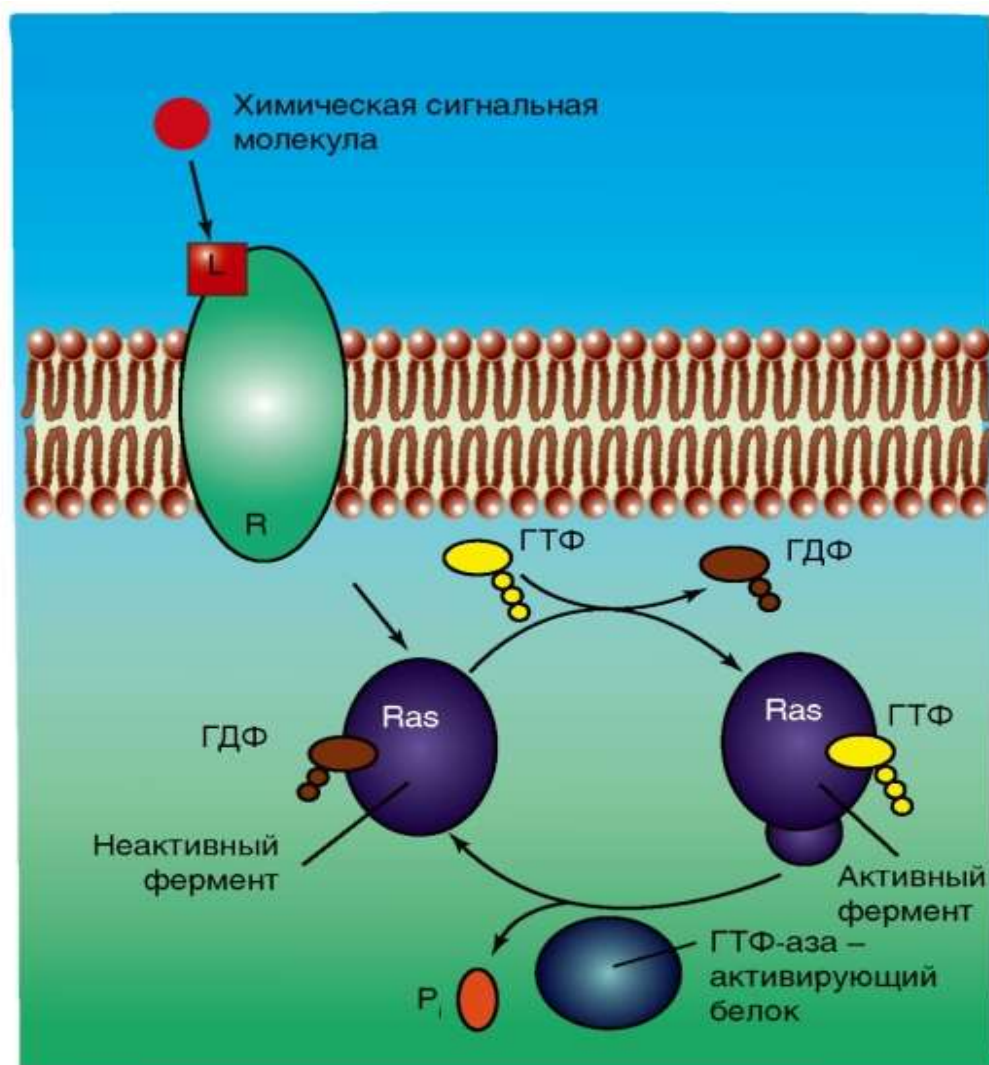


Таблица 2-2. Подсемейства мономерных ГТФ-связывающих белков и некоторые регулируемые ими внутриклеточные процессы

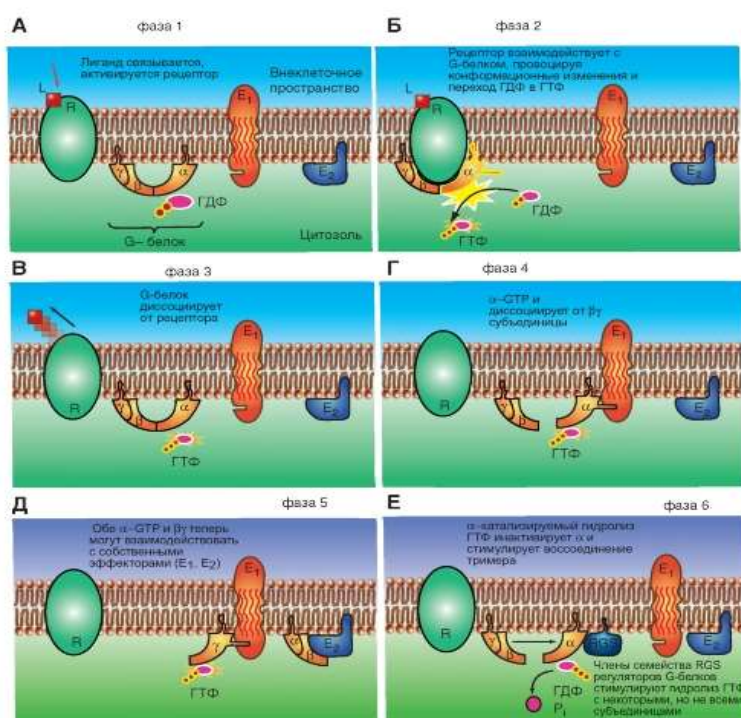
Подсемейство	Клеточные эффекты
Ras-подобные белки	Контроль роста и дифференцировки
Rho-подобные белки (включая Rac)	Контроль полимеризации актиновых филаментов и их сборки в специализированные структуры типа фокальной адгезии
Rab-подобные белки	Контроль везикулярного транспорта путем направления везикул к определенным мембранам
ARI-подобные белки	Регуляция сборки и разборки белков, покрывающих везикулы, и контроль везикулярного транспорта

Механизм работы гетеротримерных G-белков

Неактивные G-белки существуют главным образом в форме $\alpha\beta\gamma$ -гетеротримеров, с ГДФ в их позициях, связывающих нуклеотид (рис. 2-5 А). Взаимодействие гетеротримерных G-белков с присоединившим лиганд рецептором ведет к преобразованию α -субъединицы в активную форму, которая имеет повышенное сродством к ГТФ и пониженную афинность его к $\beta\gamma$ -комплексу (рис. 2-5 Б). В большинстве гетеротримерных G-белков именно α -субъединица представляет собой структуру, передающую информацию. Активация большинства G-белков приводит к конформационному изменению α -субъединицы.

В результате активированная α -субъединица освобождает ГДФ, присоединяет ГТФ (рис. 2-5 В), а затем диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера (рис. 2-5 Г). У большинства G-белков диссоциированная α -субъединица сразу взаимодействует с эффекторными белками (E_1) в пути сигнальной трансдукции (рис. 2-5 Г). Однако у некоторых G-белков освободившийся $\beta\gamma$ -димер может быть ответственным за все или за некоторые эффекты рецептор-лигандного комплекса. Затем $\beta\gamma$ -димер взаимодействует с эффекторным белком E_2 (рис. 2-5 Д). Далее показано, что члены RGS семьи G-белка стимулируют гидролиз ГТФ (рис. 2-5 Е). Это инактивирует α -субъединицу и объединяет все субъединицы в $\alpha\beta\gamma$ -гетеротример.

Рис. 2-5. Цикл работы гетеротримерного G-белка, запускающего дальнейшую цепь событий с помощью своей α -субъединицы. Обозначения: R - рецептор, L - лиганд, E - эффекторный белок



Пути сигнальной трансдукции через гетеротримерные G-белки

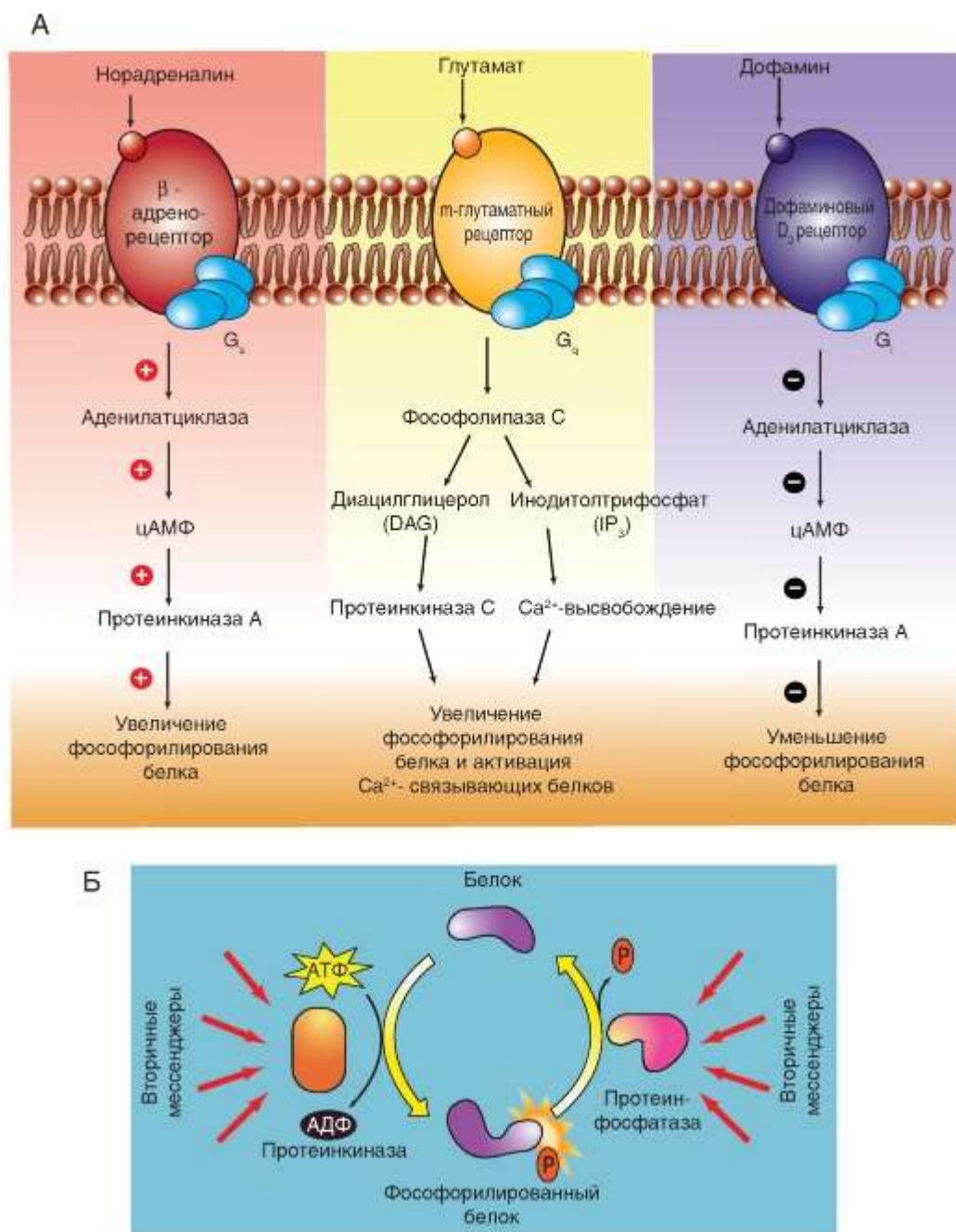
На рисунке 2-6 А показаны три лиганда, их рецепторы, связанные с разными G-белками, и их молекулярные мишени. Аденилатциклаза является основой для позитивного или негативного контроля путей сигнальной трансдукции, которые обусловлены G-белками. При позитивном контроле связывание стимулирующего лиганда, например норадреналина, действующего через β -адренергические рецепторы, ведет к активации гетеротримерных G-белков с α_s -субъединицей типа α_s («s» означает стимуляцию). Поэтому такой G-белок называют G-белком G_s -типа. Активация G_s -типа G-белков посредством связанного с лигандом рецептора приводит к тому, что его α_s -субъединица связывает ГТФ и затем диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера.

Другие регуляторные вещества, такие, как адреналин, действующий через α_2 -рецепторы, или аденозин, действующий через α_1 -рецепторы, или дофамин, действующий через D_2 -рецепторы, участвуют в негативном или ингибирующем контроле аденилатциклазы. Эти регуляторные вещества активируют G_i -тип G-белков, которые имеют α_i -субъединицу типа α_i («i» означает ингибирование). Связывание ингибирующего лиганда с его рецептором активирует G_i -тип G-белков и вызывает диссоциацию его α_i -субъединицы от $\beta\gamma$ -димера. Активированная α_i -субъединица связывается с аденилатциклазой и подавляет ее активность. Кроме того, $\beta\gamma$ -димеры могут связывать свободные α_s -субъединицы. Этим путем связывание $\beta\gamma$ -димеров со свободной α_s -субъединицей дополнительно подавляет стимуляцию аденилатциклазы, блокируя действие стимулирующих лигандов.

Еще один класс внеклеточных агонистов (рис. 2-6 А) связывается с рецепторами, которые активируют посредством G-белка, называемого G_q , β -изоформу фосфолипазы С. Она расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (фосфолипид, в малых количествах присутствующий в плазматической мембране) на инозитол-1,4,5-трифосфат и диацилглицерол, которые относятся ко вторичным мессенджерам. IP_3 , связываясь со специфичными лигандзависимыми Ca^{2+} -каналами эндоплазматического ретикулула, высвобождает из него Ca^{2+} , т.е. повышает концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. Ca^{2+} -каналы эндоплазматического ретикулула вовлечены в электромеханическое сопряжение в скелетной и сердечной мышце. Диацилглицерол вместе с Ca^{2+} активирует протеинкиназу С. К ее субстратам относятся, например, белки, участвующие в регуляции клеточного деления.

Рис. 2-6. Примеры путей сигнальной трансдукции через гетеротримерные G-белки.

А - в трех приведенных примерах связывание нейротрансмиттера с рецептором ведет к активации G-белка и последующему включению путей вторичных мессенджеров. G_s , G_q , и G_i подразумевают три различных типа гетеротримерных G-белков. Б - регуляция клеточных белков фосфорилированием ведет к усилению или угнетению их активности, а это, в свою очередь, определяет необходимую организму клеточную реакцию. Фосфорилирование белков осуществляют протеинкиназы, а дефосфорилирование - протеинфосфатазы. Протеинкиназа переносит фосфатную группу (Pi) от АТФ на сериновые, треониновые или тирозиновые остатки белков. Это фосфорилирование обратимо меняет структуру и функции клеточных белков. Оба типа ферментов - киназы и фосфатазы - регулируются различными внутриклеточными вторичными мессенджерами



Пути активации внутриклеточных протеинкиназ

Взаимодействие гетеротримерных G-белков с присоединившим лиганд рецептором ведет к преобразованию α -субъединицы в активную форму, которая имеет повышенное сродство к ГТФ и пониженную афинность его к $\beta\gamma$ -комплексу. Активация большинства G-белков приводит к конформационному изменению α -субъединицы, которая освобождает ГДФ, присоединяет ГТФ, а затем диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера. Далее диссоциированная α -субъединица взаимодействует с эффекторными белками в пути сигнальной трансдукции.

На рисунке 2-7 А продемонстрирована активация гетеротримерных G-белков G_s -типа с α -субъединицей типа α_s , которая происходит благодаря связыванию с лигандом рецептора и приводит к тому, что α_s -субъединица G-белков G_s -типа связывает ГТФ и затем диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера, а далее взаимодействует с аденилатциклазой. Это приводит к повышению уровня цАМФ и активации ПКК.

На рисунке 2-7 Б продемонстрирована активация гетеротримерных G-белков G_i -типа с α_i -субъединицей типа α_i , которая происходит благодаря связыванию с лигандом рецептора

и приводит к тому, что α -субъединица G-белков G_i -типа активируется и затем диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера, а далее взаимодействует с фосфодиэстеразой. Это приводит к повышению уровня цГМФ и активации ПКГ.

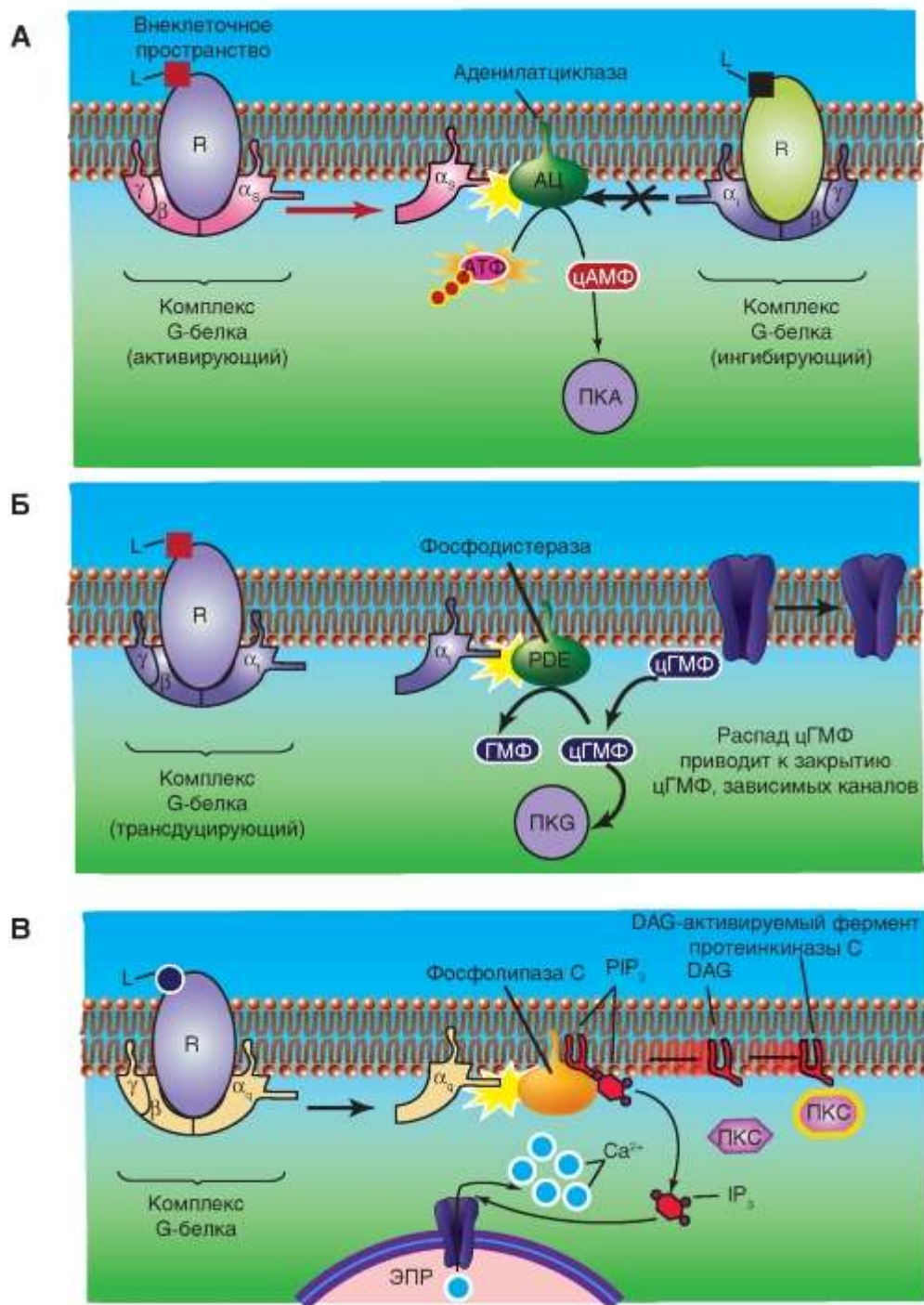
Рецептор катехоламинов α_1 взаимодействует с G_{aq} -субъединицей, активирующей фосфолипазу C. На рисунке 2-7 В продемонстрирована активация гетеротримерных G-белков G_{aq} -типа с α -субъединицей типа α_q , которая происходит благодаря связыванию лиганда с рецептором и приводит к тому, что α_q -субъединица G-белков G_{aq} -типа активируется и затем диссоциирует от $\beta\gamma$ -димера, а далее взаимодействует с фосфолипазой C. Она расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на IP_3 и DAG. Это приводит к повышению уровня IP_3 и DAG. IP_3 , связываясь со специфичными лигандзависимыми Ca^{2+} -каналами эндоплазматического ретикулума, высвобождает из него Ca^{2+} . DAG вызывает активацию протеинкиназы C. В нестимулированной клетке значительное количество этого фермента находится в цитозоле в неактивной форме. Ca^{2+} заставляет протеинкиназу C связываться с внутренней поверхностью плазматической мембраны. Здесь фермент может активироваться диацилглицеролом, который образуется при гидролизе фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата. Мембранный фосфатидилсерин также может быть активатором протеинкиназы C, если фермент находится в мембране.

Описано около 10 изоформ протеинкиназы C. Хотя некоторые из них присутствуют во многих клетках млекопитающих, однако подтипы γ и ϵ обнаружены, главным образом, в клетках центральной нервной системы. Подтипы протеинкиназы C различаются не только распределением по организму, но, по-видимому, и механизмами регуляции своей активности. Некоторые из них в нестимулированных клетках связаны с плазматической мембраной, т.е. не требуют для активации увеличения концентрации Ca^{2+} . Некоторые изоформы протеинкиназы C активируются арахидоновой кислотой или другими ненасыщенными жирными кислотами.

Первоначальная кратковременная активация протеинкиназы C происходит под действием диацилглицерола, который освобождается, когда фосфолипаза C_β активируется, а также под влиянием Ca^{2+} , освобожденного из внутриклеточных хранилищ с помощью IP_3 . Долго длящаяся активация протеинкиназы C запускается рецептор-зависимыми фосфолипазами A_2 и D. Они действуют первично на фосфатидилхолин - основной мембранный фосфолипид. Фосфолипаза A_2 отделяет от него жирную кислоту во втором положении (обычно ненасыщенную) и лизофосфатидилхолин. Оба эти продукта активируют определенные изоформы протеинкиназы C. Рецептор-зависимая фосфолипаза D расщепляет фосфатидилхолин таким образом, что образуется фосфатидная кислота и холин. Фосфатидная кислота далее расщепляется до диацилглицерола, участвующего в долговременной стимуляции протеинкиназы C.

Рис. 2-7. Основные принципы активации протеинкиназы A, протеинкиназы G и протеинкиназы C.

Обозначения: R - рецептор, L - лиганд цАМФ-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа A) и связанные с ней сигнальные пути



В отсутствие цАМФ, цАМФ-зависимая протеинкиназа (протеинкиназа А) состоит из четырех субъединиц: двух регуляторных и двух каталитических. У большинства типов клеток каталитическая субъединица одна и та же, а регуляторные субъединицы высокоспецифичны. Присутствие регуляторных субъединиц почти полностью подавляет ферментативную активность комплекса. Таким образом, активация ферментативной активности цАМФ-зависимой протеинкиназы должна вовлекать отделение регуляторных субъединиц от комплекса.

Активация происходит в присутствии микромолярных концентраций цАМФ. Каждая регуляторная субъединица связывает две его молекулы. Связывание цАМФ индуцирует конформационные изменения в регуляторных субъединицах и снижает аффинность их взаимодействия с каталитическими субъединицами. В результате этого регуляторные

субъединицы отделяются от каталитических, и каталитические субъединицы становятся активированными. Активная каталитическая субъединица фосфорилирует белки мишени по определенным сериновым и треониновым остаткам.

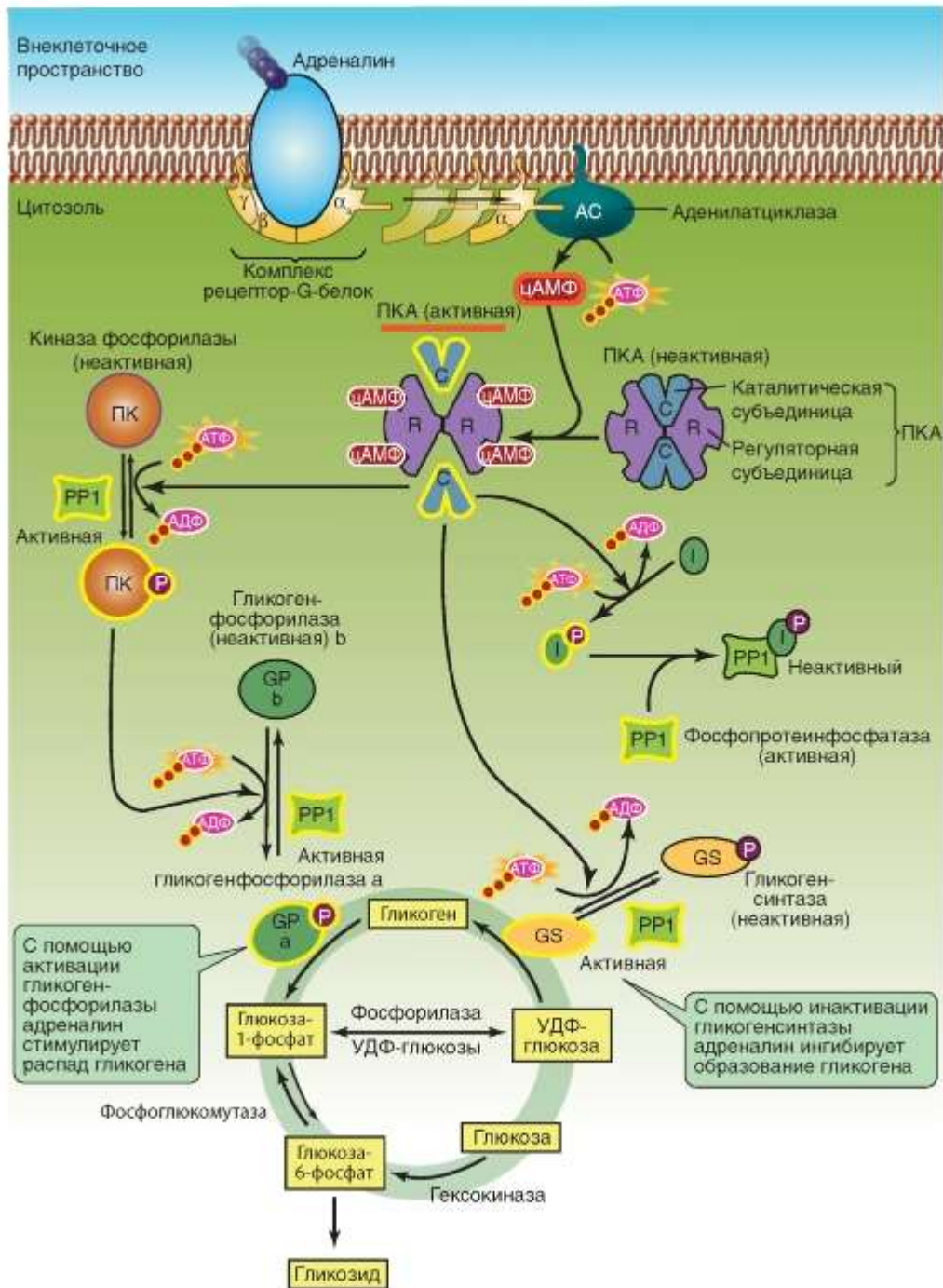
Сравнение аминокислотных последовательностей цАМФ-зависимой и других классов протеинкиназ показывает, что, несмотря на сильные различия в их регуляторных свойствах, все эти ферменты высокомологичны по первичной структуре срединной части. Эта часть содержит АТФ-связывающий домен и активный центр фермента, обеспечивающий перенос фосфата с АТФ на белок-акцептор. Участки киназ за пределами этой каталитической срединной части белка участвуют в регуляции киназной активности.

Определена также кристаллическая структура каталитической субъединицы цАМФ-зависимой протеинкиназы. Каталитическая средняя часть молекулы, имеющаяся у всех известных протеинкиназ, состоит из двух долей. Меньшая из них содержит необычный АТФ-связывающий участок, а большая доля содержит участок связывания пептида. Многие протеинкиназы содержат также регуляторный участок, известный как псевдосубстратный домен. По аминокислотной последовательности он напоминает фосфорилируемые участки субстратных белков. Псевдосубстратный домен, связываясь с активным центром протеинкиназы, ингибирует фосфорилирование истинных субстратов протеинкиназы. Активация киназы может включать фосфорилирование или нековалентную аллостерическую модификацию протеинкиназы для устранения ингибирующего действия псевдосубстратного домена.

Рис. 2-8. цАМФ-зависимая протеинкиназа А и мишени.

Когда адреналин связывается с соответствующим рецептором, активация α_s -субъединицы стимулирует аденилатциклазу с увеличением уровня цАМФ. цАМФ активирует протеинкиназу А, которая путем фосфорилирования дает три основных эффекта. (1) Протеинкиназа А активирует киназу фосфоорилазы гликогена, которая фосфорилирует и активирует фосфоорилазу гликогена. (2) Протеинкиназа А инактивирует гликогенсинтазу и таким образом уменьшает образование гликогена. (3) Протеинкиназа А активирует ингибитор фосфопроtein-фосфатазы-1 и тем самым ингибирует фосфатазу. Эффект в целом заключается в координации изменений уровня глюкозы.

Обозначения: УДФ-глюкоза - уридиндифосфатглюкоза



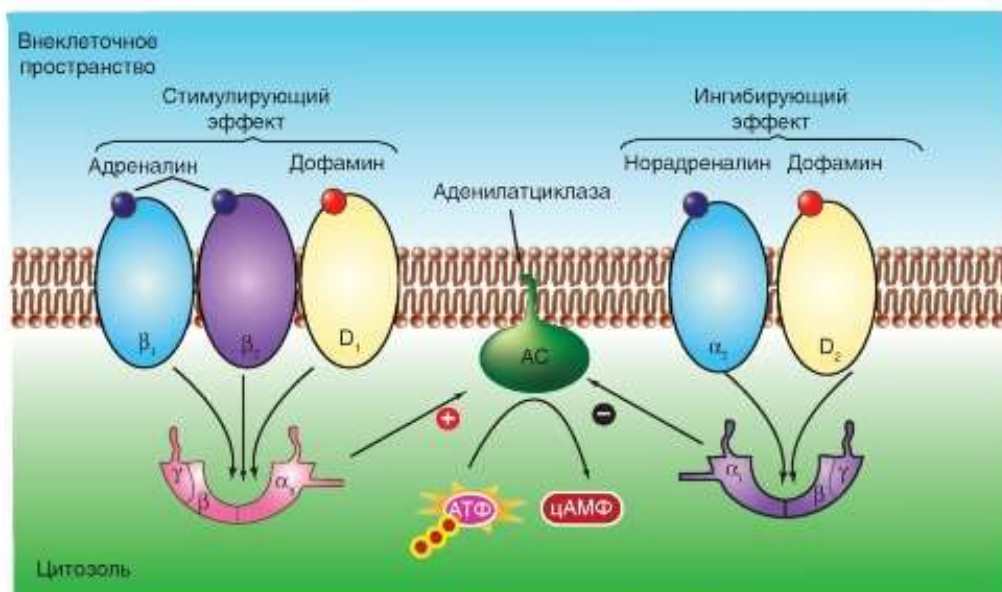
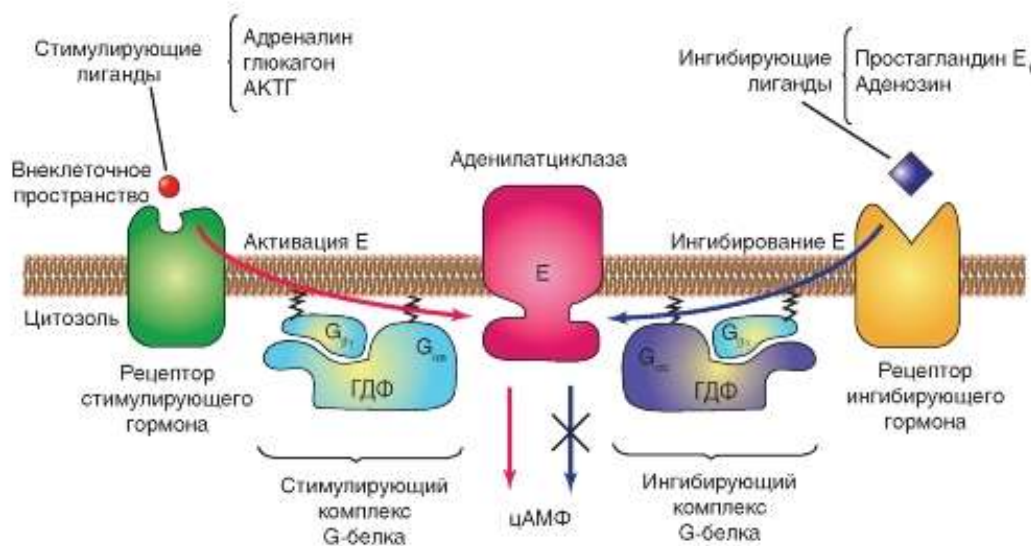
Гормональная регуляция активности аденилатциклазы

На рисунке 2-9 А представлен принципиальный механизм индуцированной гормонами стимуляции и ингибирования аденилатциклазы. Взаимодействие лиганда с рецептором, связанным с α_s -субъединицей типа α_s (стимулирующая), вызывает активацию аденилатциклазы, тогда как взаимодействие лиганда с рецептором, связанным с α_i -субъединицей типа α_i (ингибирующая), вызывает ингибирование фермента. $G_{\beta\gamma}$ -субъединица и в стимулирующих, и в ингибирующих G-белках идентична. G_{α} -субъединицы и рецепторы различны. Лиганд-стимулированное образование активных $G_{\alpha}\cdot GTP$ комплексов происходит с помощью одинаковых механизмов в обоих G_{as} - и G_{ai} -протеинах. Однако $G_{as}\cdot GTP$ и $G_{ai}\cdot GTP$ по-разному взаимодействуют с аденилатциклазой. Одна ($G_{as}\cdot GTP$) стимулирует, а другая ($G_{ai}\cdot GTP$) ингибирует ее каталитическую активность.

На рисунке 2-9 Б представлен механизм индуцированной определенными гормонами активации и ингибирования аденилатциклазы. β_1 -, β_2 - и D_1 -рецепторы взаимодействуют с субъединицами, которые активируют аденилатциклазу и повышают уровень цАМФ. α_2 -и D_2 -рецепторы взаимодействуют с G_{ai} субъединицами, которые ингибируют аденилатциклазу. (Что касается α_1 -рецептора, то он взаимодействует с G-субъединицей, которая активирует фосфолипазу C.) Рассмотрим один из примеров, представленных на рисунке. Адреналин связывается с β_1 -рецептором, что приводит к активации G_{as} -белка, который стимулирует аденилатциклазу. Это приводит к увеличению внутриклеточного уровня цАМФ, и, таким образом, усиливает активность ПКА. С другой стороны, норадреналин связывается с α_2 -рецептором, что приводит к активации G_{ai} -белка, который ингибирует аденилатциклазу и тем самым снижает внутриклеточный уровень цАМФ, уменьшая активность ПКА.

Рис. 2-9. Индуцированная лигандами (гормонами) активация и ингибирование аденилатциклазы.

А - принципиальный механизм. Б - механизм применительно к конкретным гормонам



Протеинкиназа C и связанные с ней сигнальные пути

Рецептор α_1 взаимодействует с G_{aq} -субъединицей G-белка, которая активирует фосфолипазу C. Фосфолипаза C расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на IP_3 и DAG. IP_3 , связываясь со специфичными лиганд-зависимыми Ca^{2+} -каналами эндоплазматического ретикулума, высвобождает из него Ca^{2+} , т.е. повышает концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. DAG вызывает активацию протеинкиназы C. В нестимулированной клетке этот фермент находится в цитозоле в неактивной форме. Если цитозольный уровень Ca^{2+} повышается, происходит взаимодействие Ca^{2+} с протеинкиназой C, что приводит к связыванию протеинкиназы C с внутренней поверхностью клеточной мембраны. В таком положении фермент активируется диацилглицеролом, образующимся при гидролизе фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата. Мембранный фосфатидилсерин также может быть активатором протеинкиназы C, если фермент находится в мембране.

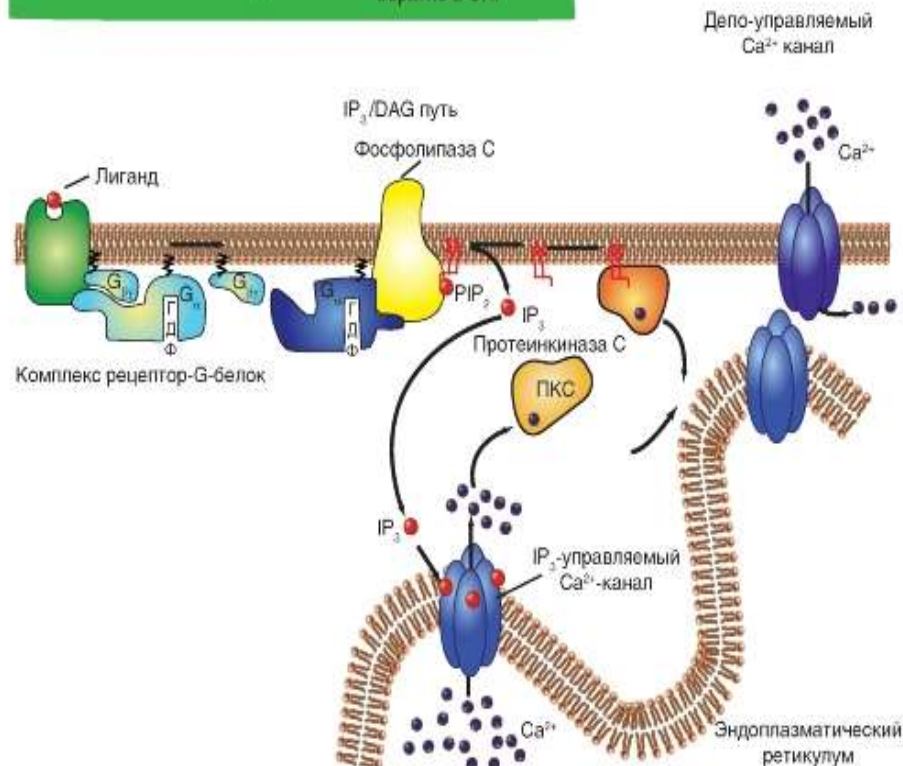
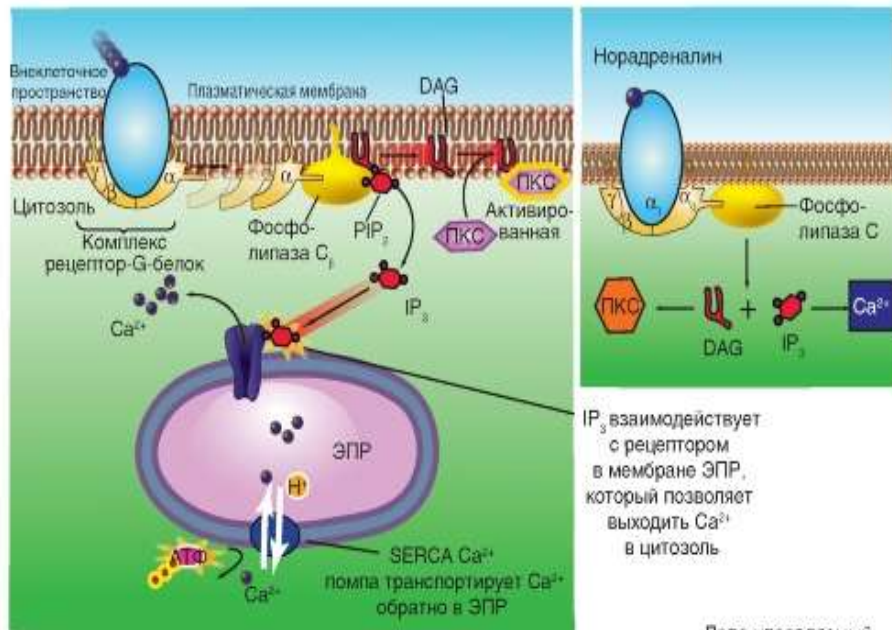
В таблице 2-3 приведены изоформы протеинкиназы C млекопитающих и свойства этих изоформ.

Таблица 2-3. Свойства изоформ протеинкиназы C млекопитающих

Группа протеинкиназы C	Подвид	Молекулярная масса, Да	Активаторы	Тканевая экспрессия
сPKC	α	76 799	Ca^{2+} , DAG, ФС, ФФА, ЛФХ	Универсальная
	βI	76 790	Ca^{2+} , DAG, ФС, ФФА, ЛФХ	Некоторые ткани
	βII	76 933	Ca^{2+} , DAG, ФС, ФФА, ЛФХ	Многие ткани
	γ	78 366	Ca^{2+} , DAG, ФС, ФФА, ЛФХ	Только головной мозг
пPKC	δ	77 517	DAG, ФС	Универсальная
	ϵ	83 474	DAG, ФС, ФФА	Головной мозг и др.
	η (L)	77 972	?	Легкие, кожа, сердце
	θ	81 571	?	Скелетные мышцы (в основном)
нPKC	ζ	67 740	ФС, ФФА	Универсальная
	λ	67 200	?	Яичники, семенники и др.

DAG - диацилглицерол; ФС - фосфатидилсерин; ФФА - цис-ненасыщенные жирные кислоты; ЛФХ - лизофосфатидилхолин.

Рис. 2-10. Сигнальные пути диацилглицерол / инозитол-1,4,5-трифосфат



Фосфолипазы и связанные с ними сигнальные пути на примере арахидоновой кислоты

Некоторые агонисты посредством G-белков активируют фосфолипазу A₂, которая действует на мембранные фосфолипиды. Продукты их реакций могут активировать протеинкиназу C. В частности, фосфолипаза A₂ отделяет от фосфолипидов находящуюся во втором положении жирную кислоту. Вследствие того, что некоторые фосфолипиды содержат в этом положении арахидоновую кислоту, вызванное фосфолипазой A₂ расщепление этих фосфолипидов освобождает значительное ее количество.

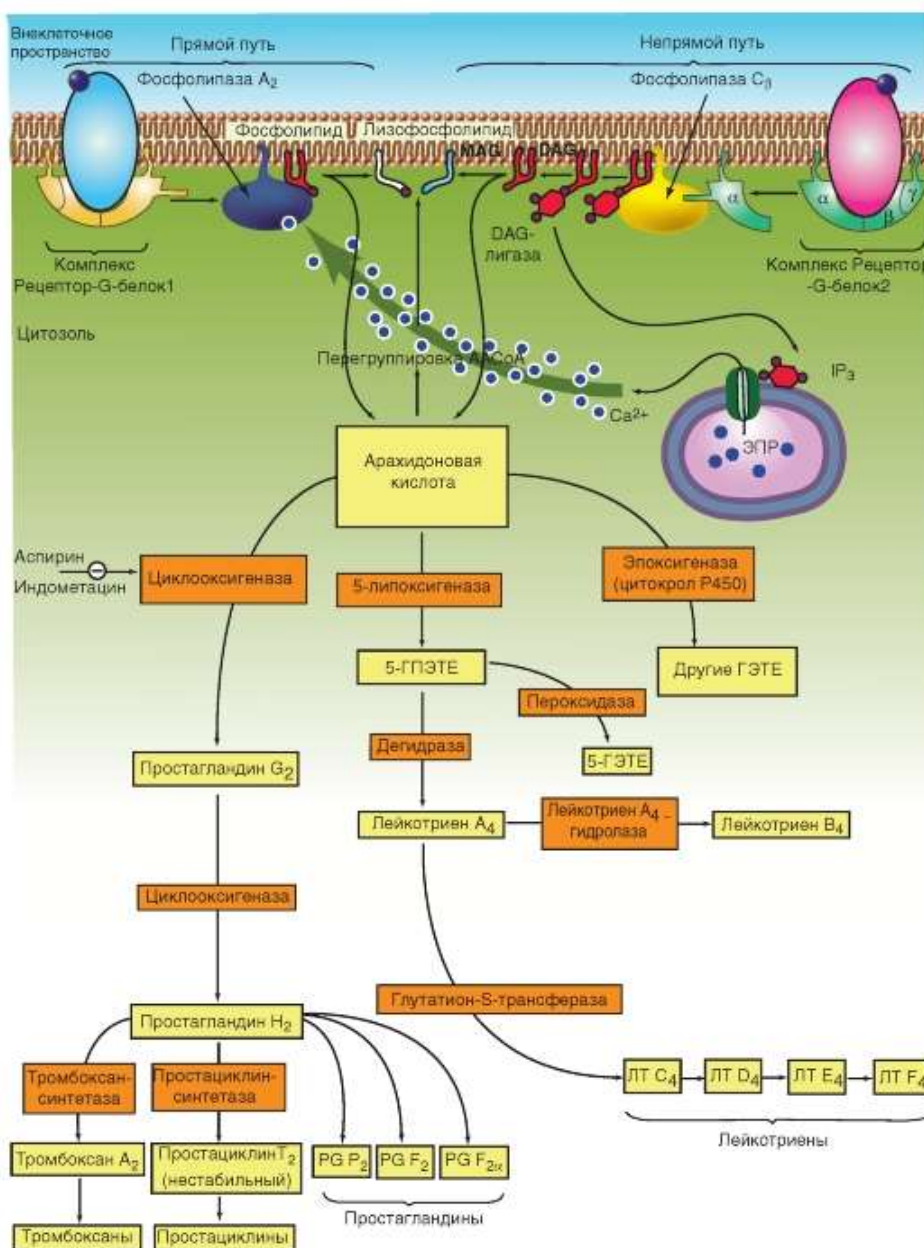
Вышеописанный сигнальный путь арахидоновой кислоты, связанный с фосфолипазой A₂, называют прямым. Непрямой путь активации арахидоновой кислоты связан с фосфолипазой C_β.

Арахидоновая кислота сама по себе является эффекторной молекулой, а кроме того, служит предшественником для внутриклеточного синтеза простагландинов, простацклинов, тромбоксанов и лейкотриенов - важных классов регуляторных молекул. Арахидоновая кислота также образуется из продуктов расщепления диацил-глицеролов.

Простагландины, простацклины и тромбоксаны синтезируются из арахидоновой кислоты циклооксигеназно-зависимым путем, а лейкотриены - липоксигеназно-зависимым путем. Один из противовоспалительных эффектов глюкокортикоидов заключается как раз в ингибировании фосфолипазы A_2 , которая освобождает арахидоновую кислоту из фосфолипидов. Ацетилсалициловая кислота (аспирин[®]) и другие нестероидные противовоспалительные средства ингибируют окисление арахидоновой кислоты циклооксигеназой.

Рис. 2-11. Сигнальные пути арахидоновой кислоты.

Обозначения: ПГ - простагландин, ЛГ - лейкотриен, ГПЭТЕ - гидропероксиэйкозатетраеноат, ГЭТЕ - гидроксиейкозатетраеноат, ЭПР - эндоплазматический ретикулум



Кальмодулин: строение и функции

Множество жизненно важных клеточных процессов, включая освобождение нейротрансмиттеров, секрецию гормонов и мышечное сокращение, регулируется цитозольным уровнем Ca^{2+} . Один из путей влияния этого иона на клеточные процессы заключается в его связывании с кальмодулином.

Кальмодулин - белок с молекулярным весом 16 700 (рис. 2-12 А). Он присутствует во всех клетках, иногда составляя до 1% их общего белкового содержимого. Кальмодулин связывает четыре иона кальция (рис. 2-12 Б и В), после чего этот комплекс регулирует активность различных внутриклеточных белков, многие из которых не относятся к протеинкиназам.

Комплекс Ca^{2+} с кальмодулином активирует также кальмодулин-зависимые протеинкиназы. Специфические кальмодулин-зависимые протеинкиназы фосфорилируют специфические эффекторные белки, например, регуляторные легкие цепи миозина, фосфоорилазу и фактор элонгации II. Мультифункциональные кальмодулин-зависимые протеинкиназы фосфорилируют многочисленные белки ядра, цитоскелета или мембранные белки. Некоторые кальмодулинзависимые протеинкиназы, такие, как киназа легкой миозиновой цепи и киназа фосфоорилазы, действуют только на один клеточный субстрат, тогда как другие полифункциональны и фосфорилируют более чем один субстратный белок.

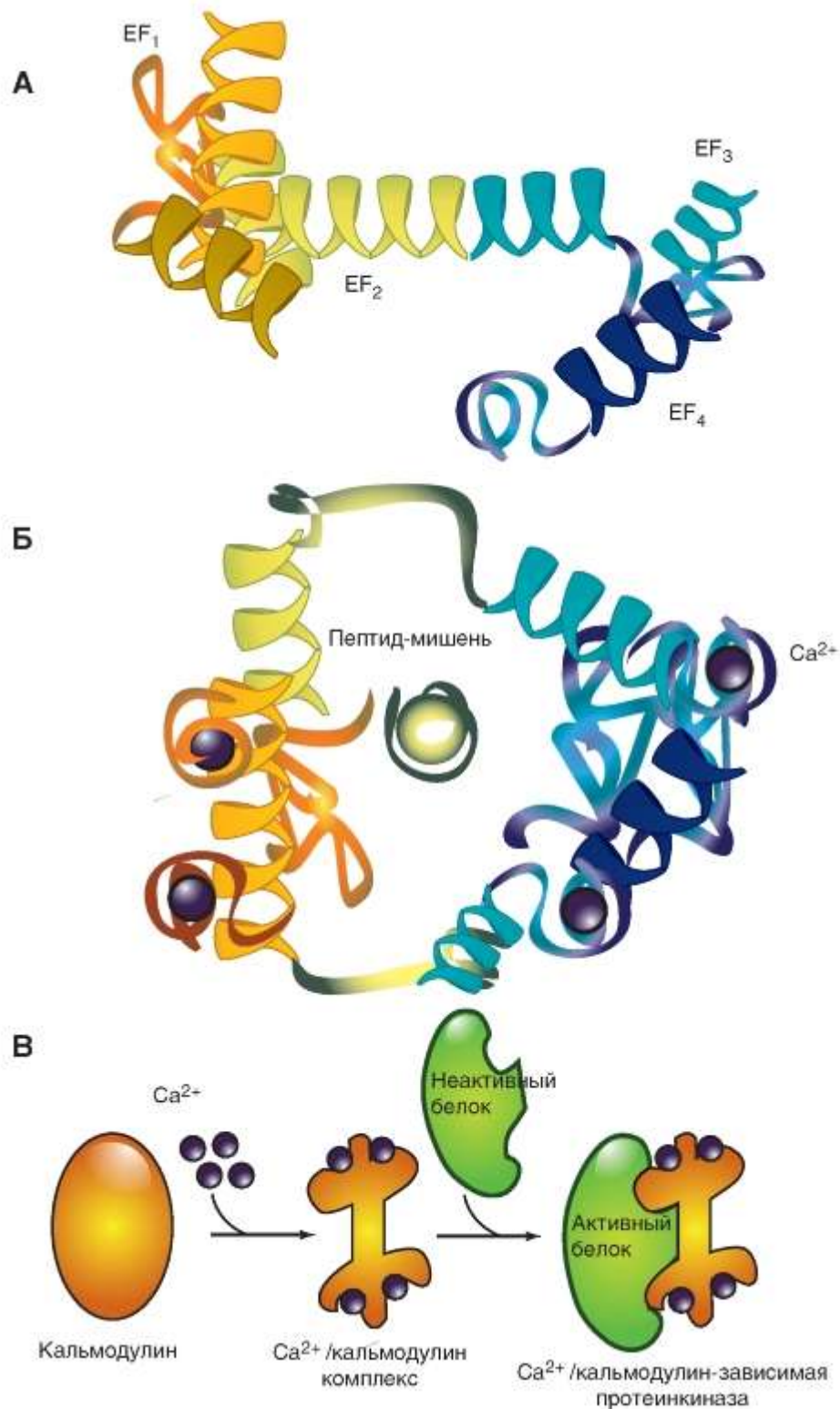
Кальмодулин-зависимая протеинкиназа II относится к мажорным белкам нервной системы. В некоторых областях головного мозга на нее приходится до 2% общего белка. Эта киназа участвует в механизме, при котором увеличение концентрации Ca^{2+} в нервном окончании вызывает освобождение нейротрансмиттера по типу экзоцитоза. Ее главным субстратом служит белок под названием синапсин I, присутствующий в нервных окончаниях и связывающийся с наружной поверхностью синаптических везикул. Когда синапсин I связан с везикулами, он предотвращает экзоцитоз. Фосфорилирование синапсина I вызывает его отделение от везикул, позволяя им выбросить нейротрансмиттер в синаптическую щель путем экзоцитоза.

Киназа легких цепей миозина играет важную роль в регуляции сокращения гладких мышц. Повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} в клетках гладких мышц активирует киназу легких цепей миозина. Фосфорилирование регуляторных легких цепей миозина приводит к длительному сокращению гладкомышечных клеток.

Рис. 2-12. Кальмодулин.

А - кальмодулин без кальция. Б - связывание кальция с кальмодулином и пептидной мишенью. В - схема связывания.

Обозначения: EF - Ca^{2+} -связывающие домены кальмодулина



Рецепторы с собственной ферментативной активностью (каталитические рецепторы)

Гормоны и факторы роста связываются с протеинами поверхности клетки, которые имеют ферментативную активность на цитоплазматической стороне мембраны. На рисунке 2-13 представлены пять классов каталитических рецепторов.

Один из характерных экземпляров трансмембранных рецепторов с гуанилатциклазной активностью, рецептор предсердного натрий-уретического пептида (ANP). Мембранный рецептор, с которым связывается ANP, не зависит от рассмотренных систем сигнальной трансдукции. Выше было описано действие внеклеточных агонистов, которые, связываясь

с мембранными рецепторами, либо активируют аденилатциклазу через G_s -белки, либо угнетают ее через G_i . Мембранные рецепторы для ANP интересны тем, что сами рецепторы обладают гуанилатциклазной активностью, стимулирующей связыванием ANP с рецептором.

ANP-рецепторы имеют внеклеточный ANP-связывающий домен, единственную трансмембранную спираль и внутриклеточный гуанилатциклазный домен. Связывание ANP с рецептором повышает внутриклеточный уровень цГМФ, что стимулирует цГМФ-зависимую протеинкиназу. В противоположность цАМФ-зависимой протеинкиназе, имеющей регуляторную и каталитическую субъединицы, регуляторные и каталитические домены цГМФ-зависимой протеинкиназы находятся на одной полипептидной цепи. цГМФ-зависимая киназа затем фосфорилирует внутриклеточные белки, что приводит к различным клеточным ответам.

Рецепторы с серин-треонин-киназной активностью фосфорилируют белки только по остаткам серина и/или треонина.

Еще одно семейство мембранных рецепторов, не сопряженных с G-белками, состоит из белков с собственной тирозин-протеинкиназной активностью. Рецепторами с собственной тирозин-протеинкиназной активностью служат белки с гликозилированным внеклеточным доменом, единственным трансмембранным участком и внутриклеточным доменом с тирозин-протеинкиназной активностью. Связывание с ними агониста, например фактора роста нервов (NGF), стимулирует тирозин-протеинкиназную активность, что фосфорилирует специфичные белки-эффекторы по определенным тирозиновым остаткам. Большинство рецепторов для факторов роста димеризуются, когда с ними связывается NGF. Именно димеризация рецептора ведет к появлению у него тирозин-протеинкиназной активности. Активированные рецепторы часто фосфорилируют сами себя, что называется аутофосфорилированием.

К надсемейству пептидных рецепторов относят рецепторы инсулина. Это также тирозин-протеинкиназы. В подклассе рецепторов, относящихся к семейству инсулиновых рецепторов, нелигандный рецептор существует как дисульфид-связанный димер. Взаимодействие с инсулином приводит к конформационным изменениям обоих мономеров, что повышает связывание инсулина, активирует рецепторную тирозинкиназу и ведет к увеличению аутофосфорилирования рецептора.

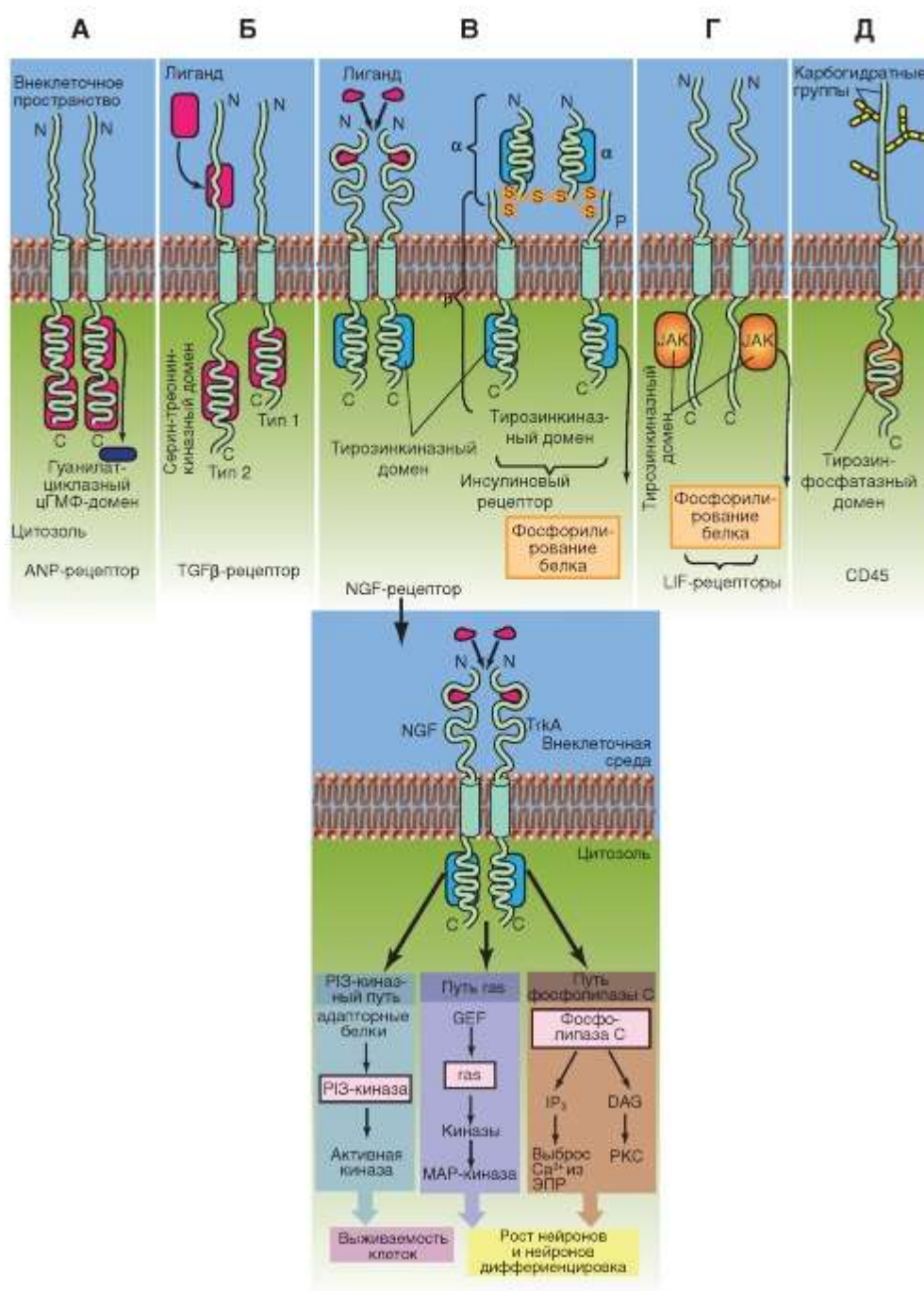
Связывание гормона или фактора роста с его рецептором запускает разнообразные клеточные ответы, включая поступление в цитоплазму Ca^{2+} , увеличение Na^+/H^+ обмена, стимуляцию захвата аминокислот и сахара, стимуляцию фосфолипазы C_β и гидролиз фосфатидилинозитолдифосфата.

Рецепторы гормона роста, пролактина и эритропоэтина, также как рецепторы интерферона и многих цитокинов, непосредственно не служат протеинкиназами. Однако после активации эти рецепторы образуют сигнальные комплексы с внутриклеточными тирозин-протеинкиназами, которые и запускают их внутриклеточные эффекты. Именно потому они не являются истинными рецепторами с собственной тирозин-протеинкиназной активностью, а просто связываются с ними.

На основе структуры можно полагать, что трансмембранные тирозин-протеинфосфатазы также представляют собой рецепторы, а их с тирозин-протеинфосфатазная активность модулируется внеклеточными лигандами.

Рис. 2-13. Каталитические рецепторы.

А - рецептор гуанилциклазы, Б - рецептор с серин-треонин киназной активностью, В - рецептор с собственной тирозин-протеинкиназной активностью, Г - рецепторы, ассоциированные с тирозин-протеинкиназной активностью



Рецептор-связанные тирозинпротеинкиназы на примере рецепторов интерферона

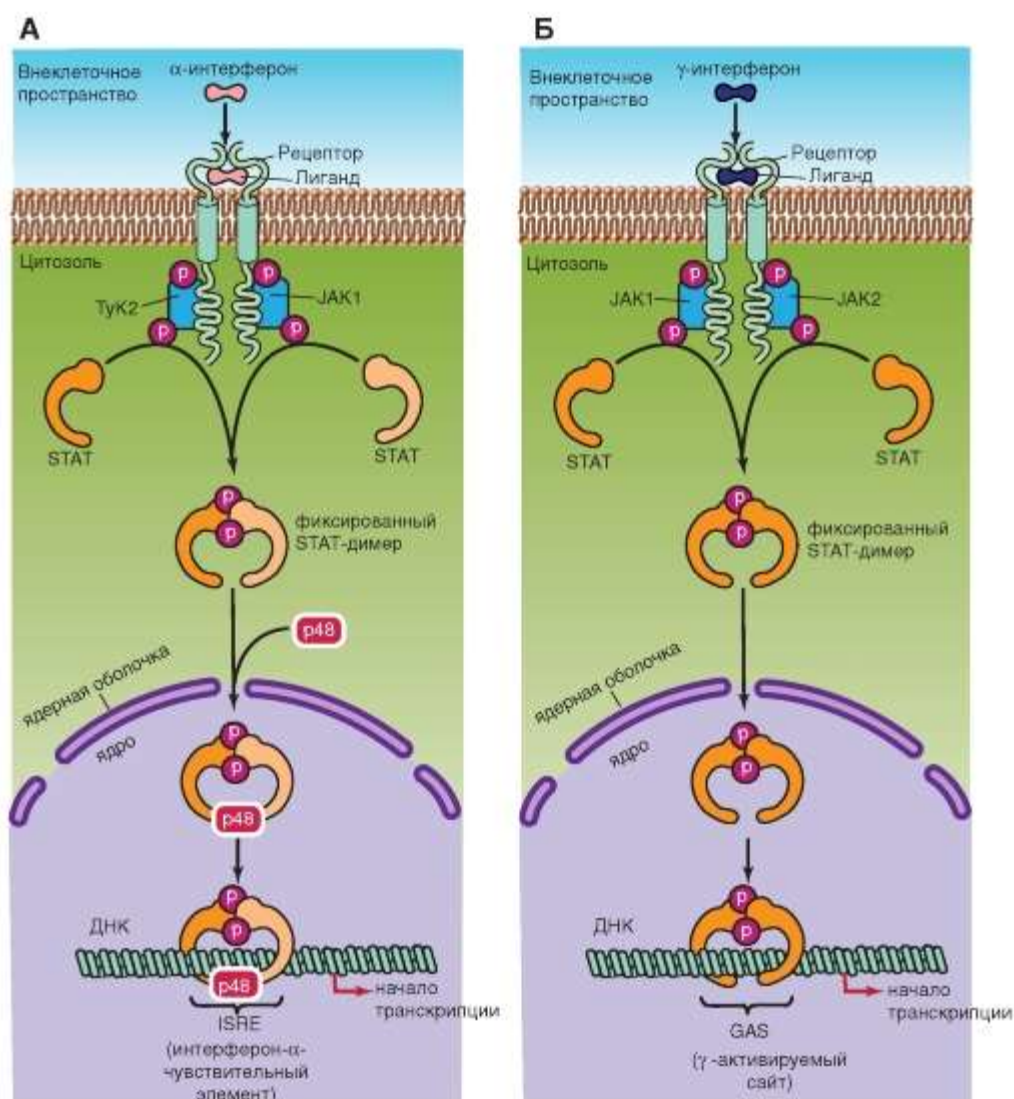
Рецепторы интерферона непосредственно не являются протеинкиназами. После активации эти рецепторы образуют сигнальные комплексы с внутриклеточными тирозин-протеинкиназами, которые и запускают их внутриклеточные эффекты. То есть они не являются истинными рецепторами с собственной тирозин-протеинкиназной активностью, а просто связываются с ними такие рецепторы называются рецептор-связанными (рецептор-зависимыми) тирозин-протеинкиназами.

Механизмы, благодаря которому эти рецепторы оказывают действие, запускаются, когда гормон связывается с рецептором, что вызывает его димеризацию. Рецепторный димер связывает одну или несколько членов *Janus*-семейства тирозин-протеинкиназ (JAK). JAK затем перекрестно фосфорилируют друг друга, а также рецептор. Члены семейства преобразователей сигнала и активаторов транскрипции (STAT) связывают фосфорилированные домены на комплексе рецептора и JAK. STAT-белки

фосфорилируются JAK-киназами и затем отсоединяются от сигнального комплекса. В конечном итоге фосфорилированные STAT-белки образуют димеры, которые двигаются к ядру, чтобы активировать транскрипцию определенных генов.

Специфичность рецептора для каждого гормона отчасти зависит от специфики членов семейства JAK или STAT, объединяющихся для образования сигнального комплекса. В некоторых случаях сигнальный комплекс также активирует MAP-(митоген-активирующий протеин)-киназный каскад с помощью адапторных белков, используемых рецепторными тирозинкиназами. Некоторые из ответов рецепторных тирозинкиназных лигандов также вовлекают JAK и STAT пути.

Рис. 2-14. Пример каталитических рецепторов, ассоциированных с тирозин-протеинкиназной активностью. Рецептор, активируемый α -интерфероном (А) и γ -интерфероном (Б)



Ras-подобные мономерные G-белки и опосредованные ими пути трансдукции

Лиганд, например фактор роста, связывается с рецептором, обладающим собственной тирозинпротеинкиназной активностью, что приводит к увеличению транскрипции в 10-ступенчатом процессе. Ras-подобные мономерные ГТФ-связывающие белки участвуют в пути сигнальной трансдукции на этапе передачи сигнала от рецепторов с собственной тирозин-протеинкиназной активностью (например, рецепторов фактора роста) на

внутриклеточные эффекторы. Активация и инактивация мономерных ГТФ-связывающих белков требуют дополнительных регуляторных белков. Мономерные G-белки активируются гуанин-нуклеотид-освобождающими белками (GNRP), а инактивируются ГТФаза-активирующими белками (GAP).

Мономерные ГТФ-связывающие белки семейства Ras служат посредниками связывания митогенных лигандов и их тирозин-протеинкиназных рецепторов, что запускает внутриклеточные процессы, ведущие к пролиферации клеток. Когда Ras-белки неактивны, клетки не реагируют на факторы роста, действующие через тирозинкиназные рецепторы.

Активация Ras запускает путь сигнальной трансдукции, приводящий в конечном итоге к транскрипции определенных генов, способствующих клеточному росту. Каскад MAP-киназы (МАРК) вовлекается в ответы при активации Ras. Протеинкиназа C также активирует каскад MAP-киназы. Таким образом, каскад MAP-киназы оказывается важной точкой конвергенции для разнообразных эффектов, вызывающих клеточную пролиферацию. Более того, здесь наблюдается перекрест между протеинкиназой C и тирозинкиназами. Например γ -изоформа фосфолипазы C активируется путем связывания с активированным Ras-белком. Эта активация передается на протеинкиназу C в процессе стимуляции фосфолипидного гидролиза.

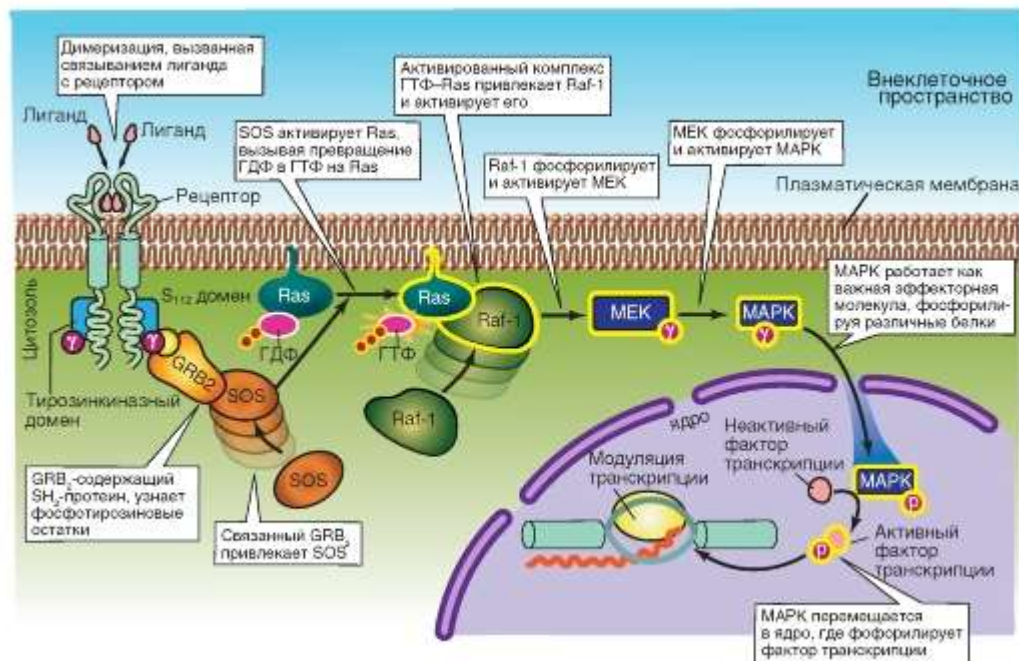
На рисунке 2-15 представлен механизм, включающий 10 ступеней.

1. Связывание лиганда приводит к димеризации рецептора.
2. Активированная тирозин-протеинкиназа (RTK) фосфорилирует себя.
3. GRB₂ (growth factor receptor-bound protein-2), SH₂-содержащий протеин, узнает фосфотирозиновые остатки на активированном рецепторе.
4. Связывание GRB₂ включает SOS (*son of sevenless*) обменный протеин гуаниннуклеотида.
5. SOS активирует Ras, формируя на Ras ГТФ вместо ГДФ.
6. Активный комплекс Ras-ГТФ активирует другие протеины физическим включением их в плазматическую мембрану. Активный комплекс Ras-ГТФ взаимодействует с N-терминальной частью серин-треонин киназы Raf-1 (известной как митоген-активирующий протеин, MAP) первой в серии последовательности активированных протеинкиназ, которые передают активационный сигнал в ядро клетки.
7. Raf-1 фосфорилирует и активирует протеинкиназу, названную MEK, которая известна как киназа MAP-киназы (МАРКК). MEK - это мультифункциональная протеинкиназа, фосфорилирующая субстраты остатков тирозина и серина / треонина.
8. MEK фосфорилирует MAP-киназу (МАРК), которая также вызывается внеклеточным сигналом - регуляторной киназой (ERK₁, ERK₂). Активация МАРК требует двойного фосфорилирования на соседних остатках серина и тирозина.
9. МАРК служит важнейшей эффекторной молекулой в Ras-зависимой сигнальной трансдукции, поскольку она фосфорилирует много клеточных протеинов после митогенной стимуляции.
10. Активированная МАРК переносится в ядро, где она фосфорилирует фактор транскрипции. В целом, активированный Ras активирует МАР

путем связывания с ней. Результатом этого каскада являются фосфорилирование и активация МАР-киназы, которая, в свою очередь, фосфорилирует факторы транскрипции, белковые субстраты и другие протеинкиназы, важные для деления и других ответов клеток. Активация Ras зависит от адаптерных белков, связывающихся с

фосфотирозиновыми доменами на активированных факторах роста рецепторах. Эти адаптерные белки присоединяются и активируют GNR (гуанин-нуклеотидобменный белок), который активирует Ras.

Рис. 2-15. Регуляция транскрипции Ras-подобными мономерными G-белками, запускаемая с рецептора с собственной тирозин-протеинкиназной активностью



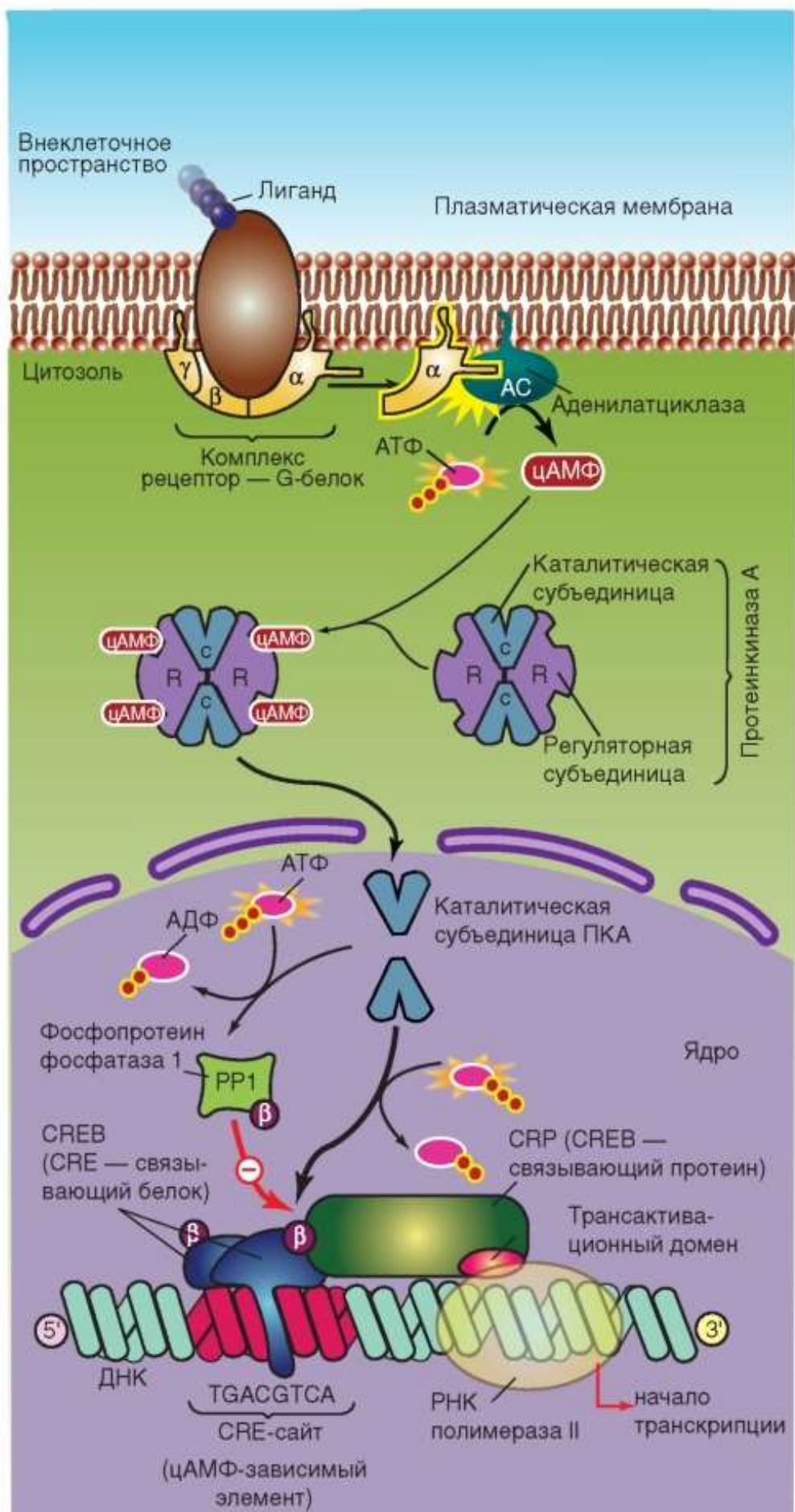
Регуляция транскрипции белком, взаимодействующим с цАМФзависимым элементом ДНК (CREB)

CREB - широко распространенный транскрипционный фактор - в норме связан с участком ДНК, названным CRE (*cAMP response element*). В отсутствии стимуляции CREB дефосфорилирован и не влияет на транскрипцию. Многочисленные пути сигнальной трансдукции посредством активации киназ (таких, как PKA, Ca^{2+} /кальмодулин-киназа IV, MAP-киназа) приводят к фосфорилированию CREB. Фосфорилированный CREB связывается CBP (*CREB-binding protein* - CREB-связывающим протеином), который имеет домен, стимулирующий транскрипцию. Параллельно фосфорилирование активирует PP1 (фосфопротеинфосфатазу 1), которая дефосфорилирует CREB, что приводит к остановке транскрипции.

Показано, что активация CREB-опосредованного механизма важна для реализации таких высших когнитивных функций, как обучение и память.

На рисунке 2-15 показано также строение цАМФзависимой PKA, которая в отсутствии цАМФ состоит из четырех субъединиц: двух регуляторных и двух каталитических. Присутствие регуляторных субъединиц подавляет ферментативную активность комплекса. Связывание цАМФ индуцирует конформационные изменения в регуляторных субъединицах, в результате чего регуляторные субъединицы отделяются от каталитических. Каталитические PKA попадают в ядро клетки и запускают изложенный выше процесс.

Рис. 2-16. Регуляция генной транскрипции с помощью CREB (*cAMP response element binding protein*) через увеличение уровня циклического аденозинмонофосфата



Глава 3. Синапсы

Электрическое взаимодействие клеток: электрический синапс

Впервые ультраструктура межклеточных контактов была подробно изучена в 1963 г. М.Г. Фаркухаром (Farquhar M.G.) и Г.Е. Палейдом (Palade G.E.) на тонких срезах различных эпителиальных клеток. В апикальной области этих клеток были выделены три специализированные структуры. На рисунке 3-1 А схематично представлена клетка с основными известными типами контактных структур.

1. В непосредственной близости к протоку располагается зона замыкания, или плотный контакт (*tight junction*). Эта зона характеризуется слиянием внешних листков мембран соседних клеток с образованием одиночной электронно-плотной полосы вдоль контакта и представляет собой сеть ветвящихся тонких гребней.

2. Непосредственно к плотному контакту примыкает зона слипания, или промежуточный контакт (*intermediate junction*). Эта зона характеризуется наличием межклеточной щели шириной 150-200 Å, заполненной гомогенным материалом низкой электронной плотности. Кроме того, для этой зоны характерен строгий параллелизм соседних клеточных мембран. В прилегающей к ней цитоплазме перпендикулярно контакту локализованы полосы плотного материала.

3. Десмосома (*desmosome*) - локальное дискообразное электронно-плотное образование, располагающееся параллельно внутреннему листку каждой клеточной мембраны. Межклеточная щель составляет около 240 Å. От каждой десмосомы внутрь цитоплазмы расходятся пучки фибрилл.

4. Введение в практику электронной микроскопии методов обработки материала солями тяжелых металлов позволило идентифицировать еще один тип контактов - щелевой контакт (*gap junction*), имеющий в области тесного сближения мембран двух соседних клеток межклеточную щель шириной 20-40 Å. Именно этот тип контактов клеток представляет значительный интерес для физиологии с позиций межклеточного взаимодействия и будет детально обсуждаться ниже.

5. Позднее в некоторых тканях беспозвоночных был обнаружен еще один тип клеточного контакта, септированный контакт (*septate junction*), в котором межклеточное пространство шириной в 150-170 Å пересекается перегородками (септами) толщиной 40-50 Å, связывающими внешние поверхности соседних клеток. Для межклеточного электрического взаимодействия основное значение имеет щелевой контакт.

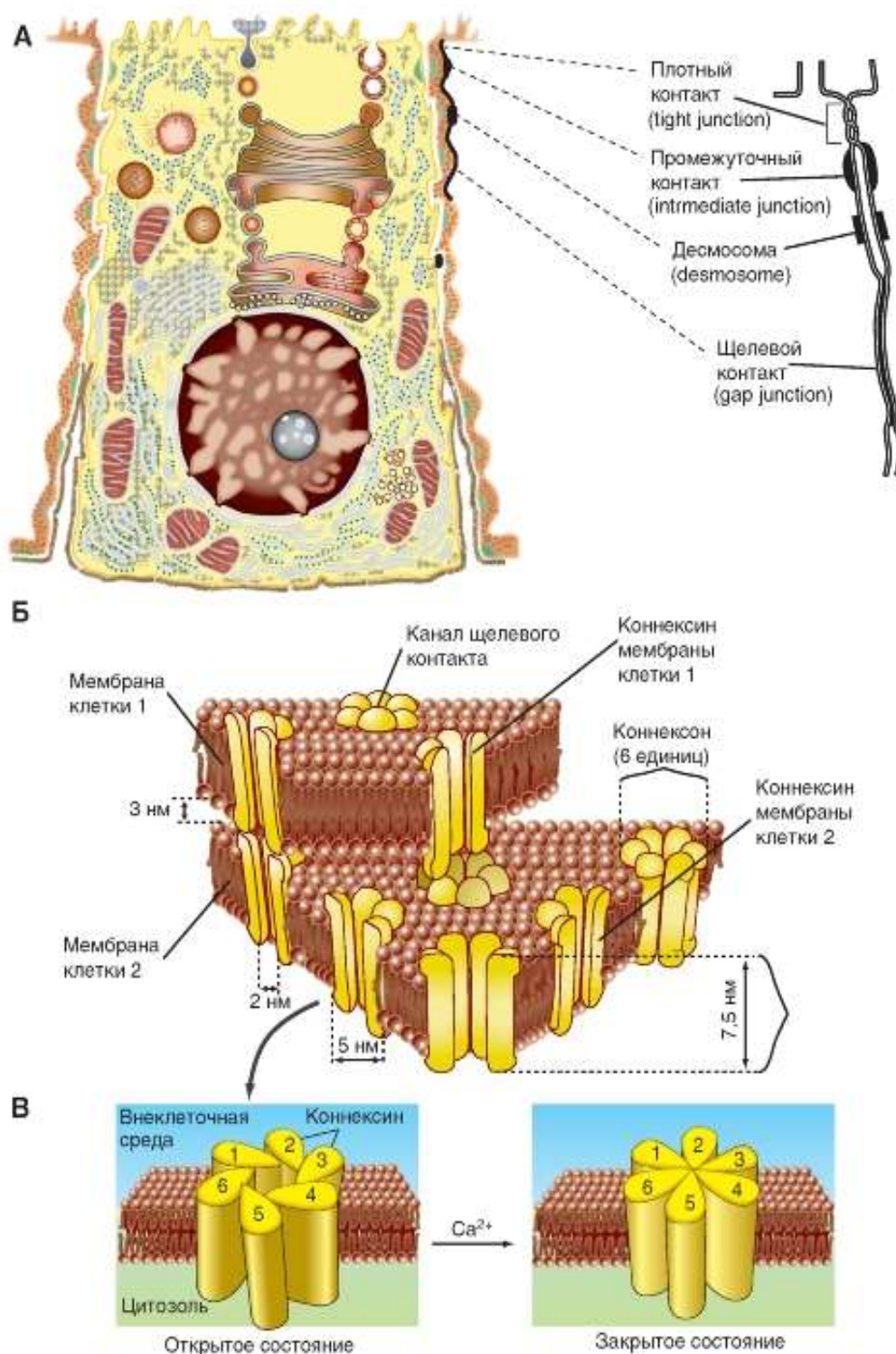
Щелевой контакт, или *gap junction*, - наиболее распространенный тип контактов между клетками практически всех тканей животных, присутствующий между клетками как электровозбудимых, так и электроневозбудимых тканей. В бислое мембран обеих клеток, образующих щелевой контакт, белковая часть представлена цилиндрическими структурами, распространяющимися по всей ширине щели и пронизывающими насквозь оба бислоя. Эти структуры представляют собой заполненные водой каналы и служат основой для осуществления физиологических функций щелевого контакта.

Модель части мембран двух клеток, имеющих щелевой контакт, представлена на рис. 3-1 Б. Щелевой контакт состоит из ряда гексагональных субъединиц - коннексонов - с расстоянием между ними 80-100 Å. Каждый коннексон состоит из шести коннексинов полипептидной природы, построенных так, что они создают канал, как бы окружая его. Проходя через бислои мембран каждой из двух соседних клеток, коннексоны выходят в межклеточную щель, где соединяются друг с другом и образуют контактную структуру в виде водного канала между цитоплазмой двух соседних клеток. В результате того, что одиночные коннексины каждого коннексона могут изгибаться относительно друг друга, центральный канал коннексона открывается или закрывается. На рис. 3-1 В представлена

модель открытого (слева) и закрытого (справа) канала щелевого контакта. Видно, что такой механизм регуляции просвета канала напоминает работу диафрагмы. Радиальное смещение (около 6 Å) каждого коннексина соответствует изменению наклона субъединицы по отношению к продольной оси коннексона только на 5°.

Рис. 3-1. Межклеточные контакты и структура щелевого контакта.

А - типы межклеточных контактов. Б - модель структуры щелевого контакта, включающая липидный бислой двух соседних клеток, содержащий коннексоны, каждый из которых построен из шести коннексинов. В - в увеличенном виде представлено открытое и закрытое состояние канала коннексона



Структура коннексонов

Коннексоны позволяют осуществлять обмен ионами и водорастворимыми молекулами с молекулярной массой до 1200-1500 Да между клетками. Это свидетельствует о возможности метаболической кооперации между клетками, когда одна клетка способна передавать другой вещества, которые последняя не синтезирует. Например, АМФ, АДФ или АТФ могут проходить через щелевой контакт. Кроме того через него может осуществляться переход из клетки в клетку цАМФ, внутриклеточного вторичного мессенджера. Эти каналы служат основой и для электротонического взаимодействия между клетками. Центральный канал коннексона может закрываться в результате увеличения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} или H^+ в одной из клеток, а также в ответ на деполяризацию одной или обеих клеток.

В целом, щелевые контакты обладают следующими свойствами и функциями:

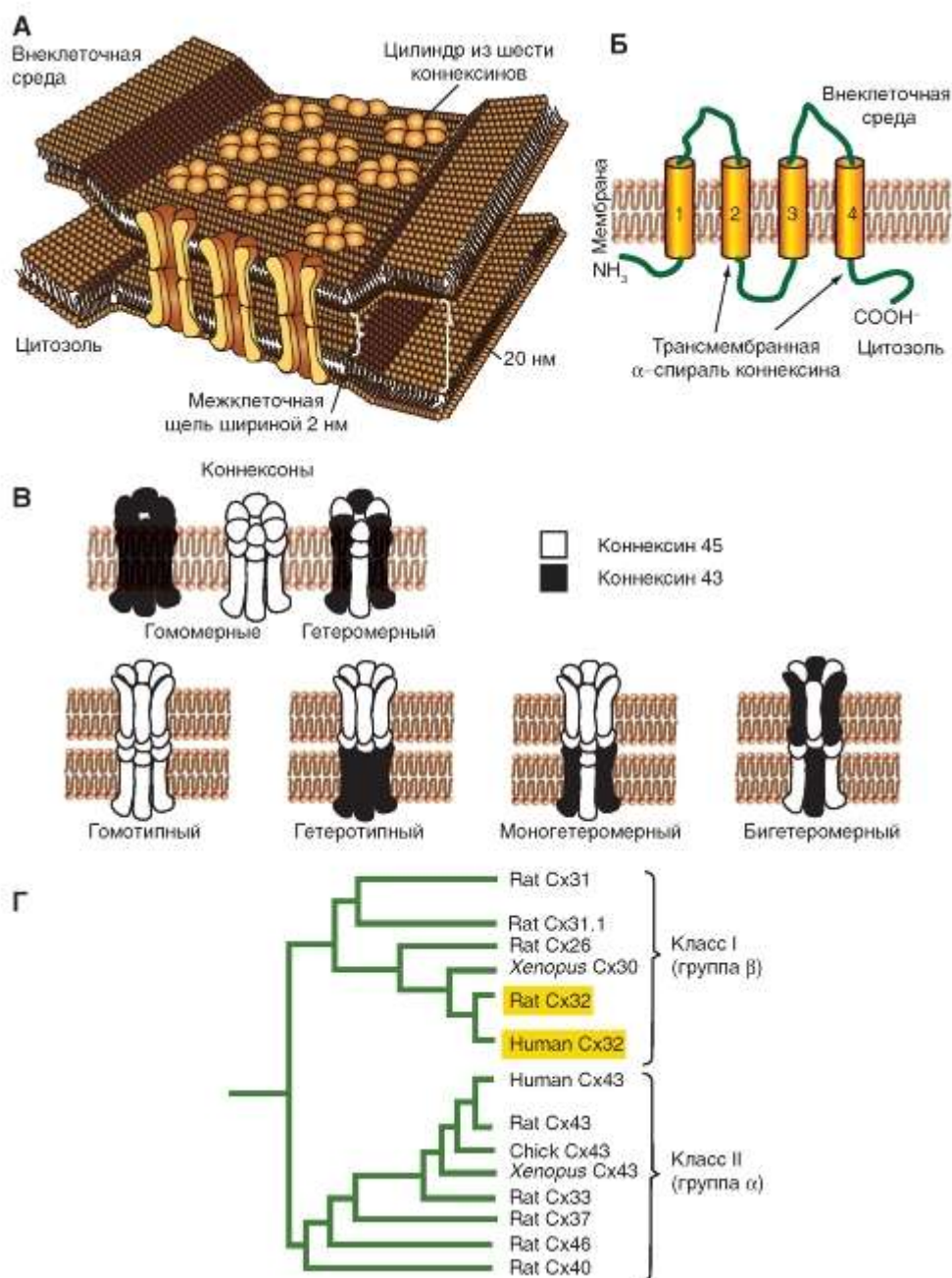
- это структуры, ответственные за эффективную диффузионную связь между клетками;
- через них могут проникать гидрофильные соединения, не способные проходить через другие участки поверхностных мембран;
- диффузионные каналы между двумя клетками изолированы от остальной межклеточной среды;
- проницаемость контактирующих мембран в области щелевых контактов резко падает при увеличении концентрации свободного внутриклеточного кальция, закисления или деполяризации любой из клеток;
- диффузионные каналы из клетки в клетку способны формироваться в течение десятков секунд или минут при тесном сближении мембран двух соседних клеток.

Пространственная модель щелевого контакта и молекулярная организация коннексина представлены на рис. 3-2 А, Б.

На рисунке 3-2 В показаны различные комбинации коннексинов, формирующих коннексоны, хемиканалы и реальные каналы. Эти данные приведены на основе коннексина (Cx) Cx45 и Cx43.

Наконец, на рис. 3-2 Г представлены две ветви филогенетического древа семейства коннексинов. Примечательно, что разница между двумя выделенными коннексинами из двух разных классов заключается только в четырех аминокислотах.

Рис. 3-2. Коннексоны и их молекулярная организация



Принцип межклеточного электротонического взаимодействия

Для анализа факторов, определяющих условия передачи возбуждения от клетки к клетке, необходимо рассмотреть эквивалентную электрическую схему области контакта, учитывающую все его основные элементы, влияющие на передачу электрического сигнала через эту область. Использование эквивалентных электрических схем позволяет на основании экспериментальных данных количественно оценивать значение того или иного элемента схемы. Контактam разной морфологической структуры соответствуют разные эквивалентные электрические схемы.

Для сравнения рассмотрим два типа клеточных контактов - плотный контакт, клеточный контакт с узкой межклеточной щелью без коннексонов, эквивалентная электрическая схема которого представлена на рис. 3-3 А, и щелевой контакт, эквивалентная электрическая схема которого представлена на рис. 3-3 Б. Последнюю модель рассматривают при условии, что сопротивление утечки стремится к бесконечности. Кроме того, считается, что весь ток проходит из одной клетки в другую по

каналам коннексонов, хорошо изолированных от окружающей среды. Эквивалентная электрическая схема в этом случае не содержит емкости. Сопротивление цитоплазмы и наружной среды принимается крайне малым. Такой подход, безусловно, представляется слишком упрощенным, но он приемлем для ряда объектов.

Если в каждую из клеток введены стимулирующие и регистрирующие микроэлектроды, то возможно определить входное сопротивление каждой клетки, обусловленное только свободными неконтактными мембранами, и сопротивление контактной мембраны. Для этого необходимо через оба стимулирующих микроэлектрода пропускать токи такой силы, чтобы потенциалы обеих клеток стали равны. При этом ток через контакт не идет, и входные сопротивления клеток легко определить:

$$R_{m,1} = V/I_1,$$

$$R_{m,2} = V/I_2.$$

Было введено понятие «коэффициент электрической связи», т.е. отношения

$$K_{1 \rightarrow 2} = V_2/V_1 = \frac{IR_{m,2}}{IR_{m,2} + IR_c} = \frac{1}{1 + R_c/R_{m,2}}, \quad (3.1)$$

$$K_{2 \rightarrow 1} = V_1/V_2 = \frac{IR_{m,1}}{IR_{m,1} + IR_c} = \frac{1}{1 + R_c/R_{m,1}}. \quad (3.2)$$

Эти коэффициенты, вообще говоря, не равны друг другу и зависят от входных сопротивлений клеток. Действительно, если сопротивление контактной мембраны в этой модели стремится к нулю, то коэффициент передачи стремится к единице.

Из этих уравнений следует, что K зависит от величины входного сопротивления клетки. Например, изменения потенциала в большой клетке могут сильно сдвинуть потенциал в соседней маленькой клетке с высоким входным сопротивлением. Наоборот, эти же изменения потенциала в маленькой клетке незначительно сдвинут потенциал в большой. Такая зависимость эффектов от клеточных размеров получила название «геометрическое выпрямление». Входное сопротивление клеток зависит не только от их величины, но и от удельного сопротивления их мембраны, поэтому всякое изменение сопротивления одной из клеток меняет электрическую связь между ними, и притом несимметрично.

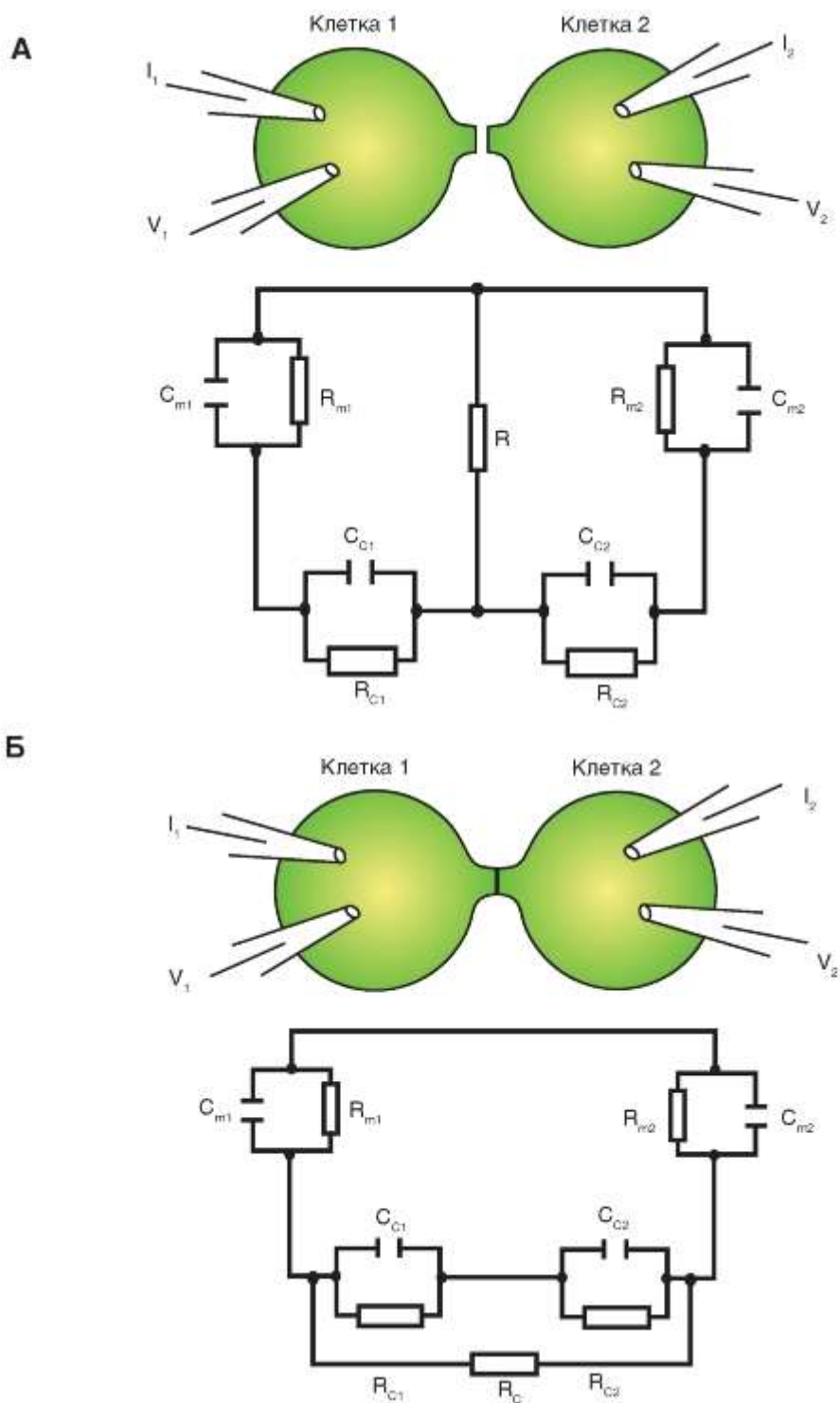
Рис. 3-3. Эквивалентные электрические схемы клеточных контактов.

А - эквивалентная электрическая схема клеточного контакта с узкой межклеточной щелью (100-200 Å) без коннексонов.

Обозначения: R_{m1} и R_{m2} - сопротивления поверхностной мембраны клеток 1 и 2, соответственно; C_{m1} и C_{m2} - емкости поверхностной мембраны клеток 1 и 2, соответственно; R - сопротивление утечки через межклеточную щель, R_{c1} и R_{c2} , C_{c1} и C_{c2} - общее сопротивление и емкость двух контактных мембран.

Б - эквивалентная электрическая схема клеточного контакта с коннексонами.

Обозначения: R_{m1} и R_{m2} - сопротивления поверхностной мембраны клеток 1 и 2, соответственно; C_{m1} и C_{m2} - емкости поверхностной мембраны клеток 1 и 2, соответственно; R - сопротивление утечки через межклеточную щель равно бесконечности; R_{c1} и R_{c2} , C_{c1} и C_{c2} - общее сопротивление и емкость двух контактных мембран, R_J - суммарное сопротивление всех коннексонов в щелевом контакте



Принципы обнаружения щелевого контакта

Существует несколько принципов, лежащих в основе обнаружения щелевого контакта.

1. Электрофизиологический способ выявления щелевого контакта при помощи пары стандартных микроэлектродов, когда сравнивают электротонические потенциалы в клетке, через которую вводится ток, и в соседней клетке, куда он распространяется, что определяет коэффициент электрической связи (рис. 3-4 А).

2. Электрофизиологический способ определения наличия щелевого контакта с помощью метода двойного *patch-clamp* и измерения I-V характеристик (рис. 3-5).

3. Метод проведения через щелевой контакт метки, когда внутриклеточно вводят меченое вещество (в большинстве случаев - флуоресцирующий краситель), для которого наружная мембрана непроницаема, и определяют возможность его перетекания в соседние клетки.

3. В последние годы для обнаружения щелевого контакта широко применяют конфокальную микроскопию с использованием меченых антител к коннекسينам.

Роль щелевого контакта в проведении возбуждения в ткани

Мембрана электровозбудимых клеток потенциалуправляема, т.е. работа ионных каналов управляется потенциалом, а изменение потенциала зависит от тока, поступающего, например, через щелевой контакт от соседних клеток. При достижении потенциала порога электровозбудимые клетки генерируют потенциалы действия, распространяющиеся, например у нейронов, по отросткам к другим нервным клеткам или эффекторным органам, у мышечных клеток запускают сокращение, а у возбудимых клеток желез управляют секрецией. Таким образом, функционирование возбудимых тканей связано с распределением потенциала и распространением тока в них. Временные и пространственные характеристики распределения потенциала и тока в тканях зависят от двух факторов: свойств электровозбудимых мембран клеток, образующих данную ткань, и геометрии ткани (как формы клеток, так и типа связей между клетками). Особенности распространения тока в цилиндрической клетке отличаются от особенностей распространения в сферической клетке. Ткань, в которой каждая клетка связана через щелевой контакт всего с одной соседней, будет отличаться от ткани, клетка которой связана с несколькими соседними. Анализ эквивалентной электрической схемы демонстрирует отличия, которые могут проявляться в электрических свойствах и функциональных особенностях ткани.

При небольших сдвигах мембранного потенциала от потенциала покоя проницаемость клеточной мембраны не меняется или меняется очень незначительно, так что ее сопротивление можно считать постоянным. Как обсуждалось ранее, обнаруженные при этом электрические свойства называют пассивными. Эти свойства имеют большое функциональное значение, так как именно они в значительной степени определяют условия возникновения возбуждения в клетке или ткани.

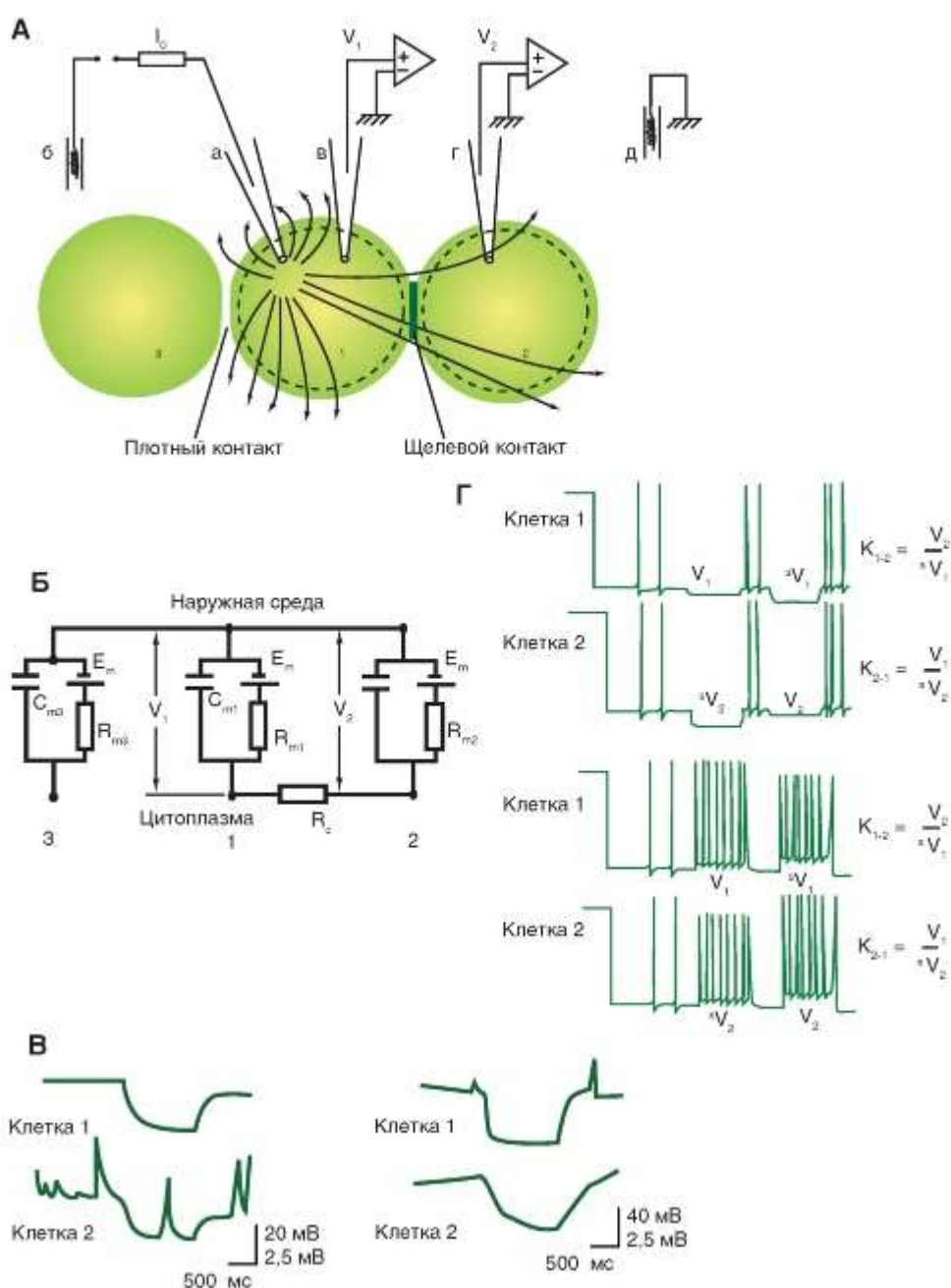
Рис. 3-4. Определение электрической передачи между клетками.

А - электрофизиологический способ определения наличия щелевого контакта и измерения коэффициента электротонической связи. Стрелки показывают направление электрического тока при пропускании через электроды «а» и «б». Б - эквивалентная электрическая схема клетки, имеющей коннексоны с одной соседней клеткой и не имеющей коннексоны с другой соседней.

Обозначения: 1, 2, 3 - соседние клетки. V_1 и V_2 - падение напряжения на клетках 1 и 2.

В - искусственная внутриклеточная гиперполяризация мембраны клетки вызывает смещение мембранного потенциала в соседней клетке, связанной щелевым контактом, и наоборот. Г - двустороннее электрическое взаимодействие нейронов. Деполяризация первой клетки вызывает смещение мембранного потенциала второй клетки, и наоборот.

Аналогично гиперполяризация первой клетки вызывает смещение мембранного потенциала во второй клетке, и наоборот



Методы изучения щелевых контактов

Рассмотрим пассивные электрические свойства сферической клетки и цилиндрического волокна, имеющие одинаковые свойства поверхностной мембраны. Уже такое сравнение достаточно четко показывает роль геометрических факторов.

В клетках, форма которых близка к сферической, сопротивление цитоплазмы крайне мало по сравнению с сопротивлением мембраны самой клетки, а эквивалентная электрическая схема совпадает с эквивалентной схемой мембраны, т.е. представляет собой параллельно соединенные сопротивление и емкость. Мы рассмотрим здесь две пассивные электрические характеристики сферической клетки: входное сопротивление (R_{in}) и постоянную времени (τ). Входное сопротивление - отношение разности потенциалов на мембране, возникающей при пропускании через клетку постоянного тока,

к величине этого тока. Для сферической клетки эта величина совпадает с сопротивлением всей ее поверхностной мембраны. При подаче прямоугольного импульса электрического тока между внутренней частью клетки и наружной средой потенциал на ее мембране лишь постепенно достигает установившегося значения, изменяясь по закону:

$$V = IR_{in}(1 - e^{-t/\tau}), \text{ где } \tau = R_{in}C. \quad (3.3)$$

Этот вопрос детально проанализирован при обсуждении механизма пассивного электротонического потенциала.

Обсудим функциональное значение R_{in} . Если на клетку действует синаптический сигнал, а время его действия велико, так что можно пренебречь емкостью мембраны, то синаптический ток будет равен:

$$I_s = E/(R_{in} + R_s), \quad (3.4)$$

где E - разность потенциала покоя и равновесного потенциала данного синапса; R_s - сопротивление синапса.

При влиянии одного или нескольких синапсов R_s много больше R_{in} и, следовательно, синаптический ток равен:

$$I_s = E/R_s. \quad (3.5)$$

Сдвиг потенциала на мембране клетки, создаваемый этим током, равен:

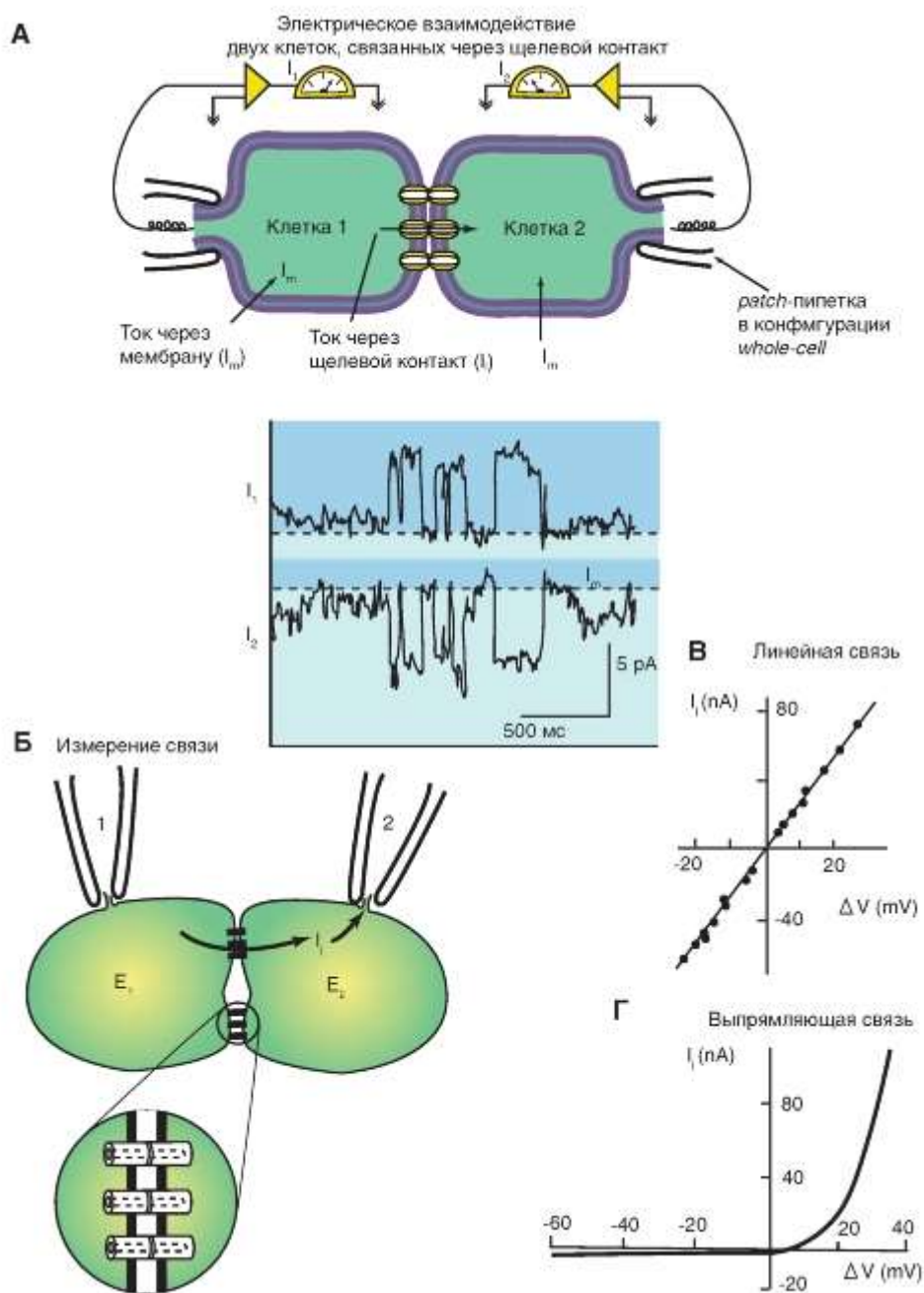
$$V_s = I_s R_{in} = ER_{in}/R_s. \quad (3.5)$$

Следовательно, V_s прямо пропорционально R_{in} . Таким образом, если клетка имеет большие размеры и соответственно маленькое R_{in} , то такой же синапс незначительно изменяет ее потенциал, в то время, как маленькую клетку он может возбудить. Следовательно, R_{in} влияет на эффективность действия синапса на клетку, определяя возможность возникновения возбуждения.

Рассмотрим теперь функциональное значение постоянной времени клетки. Обсудим только один из аспектов. Обычно для возбуждения даже маленькой клетки недостаточно активации всего одного синапса. Однако после прекращения работы синапса созданный им на мембране потенциал не спадает мгновенно. Его спад идет экспоненциально с постоянной времени τ . Другими словами, емкость клеточной мембраны постепенно разряжается через ее сопротивление. Если теперь тот же синапс будет активирован вторично, то создаваемый им сдвиг потенциала станет суммироваться с остаточным сдвигом, сохранившимся от первой активации синапса. Такой процесс называют временной суммацией. Ясно, что процесс временной суммации проходит тем эффективнее, чем больше постоянная времени мембраны. Таким образом, величина τ , в частности, определяет способность клетки к временной суммации.

Рис. 3-5. Изучение электрической передачи между клетками методом двойного *patch-clamp* и измерения I-V характеристик.

А - метод двойного *patch-clamp*. Показаны одиночные коннексоны. Поскольку потенциал клетки 1 фиксирован на -40 мВ, а потенциал клетки 2 фиксирован на -80 мВ, электрический ток течет через щелевой контакт от клетки 1 к клетке 2. Б - проведение электрического тока через коннексоны при исследованиях методом двойного *patch-clamp*. Коннексоны увеличены. В - линейная вольт-амперная характеристика септального электрического синапса речного рака. Г - вольт-амперная характеристика аномального выпрямления, т.е. асимметрия в проведении через гигантский электрический синапс речного рака. Примечание: для понимания разницы в вольт-амперных кривых на панелях В и Г вернитесь к описательной части рис. 3-3



Транспорт веществ через щелевой контакт

Одно из важнейших свойств щелевого контакта как транспортной системы состоит в том, что при его наличии между соседними клетками может осуществляться интенсивный диффузионный обмен гидрофильными соединениями с молекулярной массой до 1500 Да, минуя наружную среду. Через коннексоны щелевого контакта проходят неорганические

ионы (Na^+ , K^+ , Cl^- , I^- , SO_4^{2-}), сахара (мальтоза, мальтотриоза, мальтотетроза, сахароза), аминокислоты (аспарагиновая, глутаминовая, гексоглицин), нуклеотиды (гипоксантин, аденин, уридин, тиогуанин). Заметим, что многие из перечисленных веществ не способны диффундировать через наружную мембрану клеток.

Электрический синапс

Принцип работы электрического синапса показан на рис. 3-6 А. Механизм передачи сигнала через электрический синапс аналогичен механизму распространения потенциала действия по нервному волокну. В нервном волокне потенциал действия возникает за счет разности потенциалов между возбужденной и невозбужденной областями. Это вызывает открытие Na^+ -каналов и генерацию импульса заново на каждом последующем участке волокна. В электрическом синапсе в результате разности потенциалов между возбужденным и невозбужденным участками возникают локальные токи, и потенциал из возбужденной терминали аксона распространяется в постсинаптическую клетку, пройдя через ее мембрану и замыкаясь снаружи. Это приводит к открытию Na^+ -каналов в мембране постсинаптической клетки и возникновению там потенциала действия. Такой механизм работы требует низкого сопротивления пре- и постсинаптической мембран, что обеспечивается наличием коннексонов.

Основные функции электрических синапсов сводятся к следующим.

1. Быстродействие, что позволяет обеспечивать быстрые реакции организма. Например, гигантские нейроны нервных ганглиев пиявок обеспечивают быстрые сокращения продольной мускулатуры через нейронные цепи, связанные посредством электрических синапсов.

2. Синхронизация работы нейронов. В этом случае электрическая связь клеток обеспечивает их

синхронную работу. Наиболее известные системы таких пар нейронов обеспечивают одновременную работу органов двух сторон тела, например синхронное сокращение продольных мышечных волокон у пиявки.

3. Возникновение импульсных разрядов в группе электрически связанных клеток. Например, у тритона 30 нейронов, связанных электрическими синапсами, запускают реакцию избегания. При возбуждении любого из этих нейронов сразу же включаются все, что обеспечивает полноценность реакции животного.

4. Выпрямление сигнала, что обеспечивает его передачу только в одном направлении. Это хорошо продемонстрировано в мотонейронах пиявок. Односторонняя передача сигнала необходима, чтобы этот сигнал не попал в другую систему с электрической передачей.

Роль щелевого контакта в сердце

В сердечной ткани передача сигнала от клетки к клетке осуществляется только электротонически (рис. 3-6 Б) через щелевые контакты, названные применительно к ткани сердца нексусами. Это достаточно старый термин, не отражающий существа передачи электрического сигнала, мы вводим его для снятия естественных вопросов в случае чтения литературы, посвященной миокардиальной ткани.

В сердце электрическая связь показана для клеток всех его отделов, в том числе между клетками с разной дифференцировкой, например между волокнами Пуркинье и клетками рабочего миокарда. Поскольку щелевые контакты между клетками обладают низким сопротивлением относительно мембраны контактирующих клеток, возбужденная клетка может передавать сигнал невозбужденной, в результате чего эта последняя возбуждается.

Нарушение щелевых контактов между клетками ухудшает условия для распространения возбуждения, что может привести к возникновению частичных или полных блоков проведения на отдельных участках ткани и возникновению различных патологических режимов работы сердца. Однако при повреждении или гибели миокардиальных клеток происходит блокирование проводимости коннексонов между нормальной и поврежденной клетками. Это способствует резкой локализации повреждения и увеличивает жизнеспособность сердца.

Лиганд-рецепторное взаимодействие (основные определения)

Лиганд - это молекула, которая может взаимодействовать с участком связывания (местами связывания) так называемого молекулярного рецептора - специфическим участком молекулы, в основном белковой природы, встроенной, например, в мембрану клетки или находящейся в цитоплазме. Механизм связывания - либо электрическое притяжение между противоположно заряженными ионными или полярными группами лиганда и участка связывания белка, либо слабое притяжение, обусловленное вандер-ваальсовыми силами между неполярными областями двух молекул. В этом взаимодействии не участвуют ковалентные связи. Белок - молекулярный рецептор может содержать несколько участков связывания, каждый из которых специфичен в отношении определенного лиганда.

Существует два понятия, заложенные исторически в термин «рецептор». В одном случае под термином «рецептор» подразумевают нервные окончания чувствительного нейрона или специализированные нервные клетки, но в другом случае под понятием «рецептор» чаще понимают белковую структуру, рассматриваемую на клеточном уровне, которая имеет участки связывания для сигнальных молекул, например гормонов, трансммиттеров и т.д. Эту белковую структуру часто называют молекулярным рецептором.

Взаимодействие лиганда и участка связывания молекулярного рецептора лежит в основе реализации множества функций как самих белков, так и клеток в целом. Для реализации подобного механизма связывания необходимо, чтобы лиганд находился практически рядом с участком связывания белка, поскольку в противном случае сила электрического притяжения между противоположно заряженными областями на участке связывания молекулярного рецептора и лиганде будет мала. Кроме того, эта сила значительно уменьшается по мере увеличения расстояния между молекулярным рецептором и лигандом. Например, слабые ван-дер-ваальсовы силы действуют только между неполярными группами, расположенными очень близко друг к другу. Эта близость достигается тем, что форма лиганда комплементарна форме участка связывания. Образно можно сказать, что лиганд подходит к участку связывания молекулярного рецептора, как ключ к замку.

Взаимодействие лиганда с участком связывания молекулярного рецептора может быть строго специфичным, и, следовательно, участок связывания

может связывать только один тип лиганда. Эта способность участка связывания молекулярного рецептора взаимодействовать только со строго специфическим лигандом называется химической специфичностью, поскольку участок связывания определяет(ся) тип(ом) химической связи.

Хотя некоторые участки связывания имеют химическую специфичность, которая позволяет им связывать только один тип лиганда, другие участки менее специфичны и, таким образом, способны связывать ряд родственных лигандов, поскольку фрагмент каждого такого лиганда может быть комплементарен форме участка связывания. По этому принципу можно выделить участки связывания с высоким сродством к лиганду, с промежуточным сродством и низким сродством.

Молекулярные рецепторы имеют различные аминокислотные последовательности и, соответственно, имеют, различную конфигурацию. Следовательно, они имеют участки связывания различной формы, каждый из которых имеет свою собственную химическую специфичность.

Сила связывания лиганда с участком связывания белка известна как его аффинность или сродство. В зависимости от того, с какой стороны описывают аффинность (с позиций лиганда или с позиций участка связывания), говорят либо об аффинности лиганда по отношению участку связывания рецептора, либо об аффинности участка связывания по отношению к лиганду. В общем случае говорят об аффинности лиганд-рецепторного взаимодействия.

Аффинность лиганда по отношению к участку связывания определяет, насколько вероятно то, что связанный лиганд покинет поверхность белка и вернется в несвязанное состояние.

Другим фактором, определяющим процент насыщения участков связывания, является аффинность участка связывания к лиганду (в отличие от аффинности лиганда к участку связывания).

Участок связывания, который прочно связывает лиганд, называют участком связывания с высоким сродством (высокоаффинным участком связывания - *high-affinity binding site*), а тот участок, с которым лиганд связывается слабо, называют участком связывания с низким сродством (низкоаффинным участком связывания - *low-affinity binding site*). Кроме того, известны участки связывания с промежуточной аффинностью (*intermediate-affinity binding site*).

Обычные столкновения между молекулами, находящимися в растворе, и рецептором, содержащим связанный лиганд, могут привести к вытеснению непрочно связанного лиганда. Мерой сродства участка связывания к лиганду служит концентрация лиганда, необходимая для обеспечения 50% насыщения; чем более низкая концентрация лиганда необходима для связывания его с половиной центров связывания, тем больше аффинность участка связывания к лиганду.

Аффинность и химическая специфичность представляют собой два основных свойства участков связывания. Химическая специфичность зависит только от формы участка связывания, а аффинность зависит от силы притяжения между рецептором и лигандом.

Между лигандами, находящимися в растворе, и соответствующими участками связывания белка быстро достигается равновесие, так что в любой момент некоторые свободные лиганды становятся связанными со свободными участками связывания, а некоторые связанные лиганды освобождаются от участков связывания. Для описания этой ситуации применяют понятие насыщение (сатурация), определяющее совокупность участков связывания, содержащих связанный лиганд в данный момент времени. Когда заполнены все участки связывания, говорят о 100% насыщении. Когда лиганд связан с половиной имеющихся участков связывания, система насыщена на 50% и т.д. Единичный участок связывания также будет насыщен на 50%, если он содержит связанный лиганд в течение 50% времени.

Процент насыщения участков связывания зависит и от концентрации свободного лиганда в растворе, и от аффинности участка связывания к лиганду. И, как и степень выраженности биологического эффекта, он будет увеличиваться с увеличением количества занятых лигандом участков связывания до тех пор, пока все они не будут заполнены. Дальнейшее увеличение концентрации лиганда не приведет ни к какому результату, поскольку все участки связывания уже заняты.

В ряде случаев с определенными участками связывания наблюдается конкуренция между лигандами за один и тот же участок связывания.

Например, если в растворе присутствуют два конкурирующих лиганда «А» и «Б», то увеличение концентрации лиганда «А» приведет к увеличению количества связанного лиганда «А», уменьшая, таким образом, количество участков, доступных для лиганда «Б», и снижая количество связанного лиганда «Б». Многие лекарства обеспечивают свое действие путем конкуренции за участки связывания с эндогенными лигандами организма. Занимая связывающий участок, лекарство уменьшает количество природного лиганда, который может быть связан с этим центром.

Лиганды могут быть агонистами или антагонистами.

Агонист - это лиганд, который взаимодействует с участком связывания и изменяет состояние молекулярного рецептора, заканчивающееся биологическим ответом. Например, в химическом синапсе агонистами называют вещества, действующие подобно трансмиссеру.

Обычные (классические) агонисты (*conventional agonists*) усиливают активность рецептора, тогда как обратные агонисты (*inverse agonists*) уменьшают эту активность.

Основной, или ортостерический участок связывания

Экзогенные агонисты могут действовать посредством связывания с тем же самым участком связывания, как эндогенные агонисты (*primary* - основной, или *orthosteric* - ортостерический участок связывания) или реже с другой частью макромолекулы рецептора (аллостерический, или аллотопический участок связывания). Агонисты этой второй категории иногда называют аллостерическими (аллотопическими) активаторами, или аллостерическими (аллотопическими) агонистами.

Некоторые агонисты (например, глутамат) могут быть эффективны только в присутствии другого лиганда (например, глицина в случае глутамата), который взаимодействует с другим участком связывания на макромолекуле рецептора. В этих условиях глутамат представляет собой первичный агонист, а глицин выступает как ко-агонист.

Наряду с агонистами существуют химические соединения, которые хотя и взаимодействуют с участком связывания на макромолекуле рецептора, но не могут открыть ионный канал. Занимая участок связывания, они препятствуют рецепции естественного трансмиссера и возникновению его эффекта, поскольку действуют на ту же самую макромолекулу рецептора, что и агонист. Такие вещества называют антагонистами.

Антагонизм может быть химическим или функциональным.

Химический антагонизм - это результат наличия в среде антагониста и способности участка связывания белка взаимодействовать с ним. Функциональный антагонизм происходит на участках клетки, не имеющих отношения к рецептору, опосредующему ответ агониста.

Функциональный антагонизм может осуществляться с помощью разных механизмов в виде непрямого физиологического антагонизма. Непрямой антагонизм представляет собой конкуренцию антагониста и агониста за место

связывания с лигандом в промежуточной макромолекуле, которая участвует в осуществлении агонистом его биологической реакции. Связывание этого участка на промежуточной молекуле с антагонистом не дает возможности осуществиться этой реакции. При физиологическом антагонизме действие одного агониста обычно через

другой рецептор оказывает противоположный эффект по отношению к эффекту, свойственному оригинальному агонисту.

Поскольку белки вовлечены практически во все процессы, происходящие в клетке, механизмы, контролирующие эти функции, сконцентрированы на регуляции активности белков. Известно два способа регуляции активности белков: (1) посредством изменения конформации молекулы белка, что влияет на связывание лиганда, и (2) через регуляцию синтеза и деградации белков, что определяет типы белков и их количество в клетке. В контексте настоящего материала представляется важным коротко обсудить первый тип регуляции - контроль за конформацией молекулы белка.

Поскольку конформация белков зависит от электрического притяжения между заряженными или поляризованными группами в различных областях белка, изменение в распределении заряда вдоль полипептидной цепи или полярности молекул, непосредственно окружающих его, изменяет конформацию белка. Известны два механизма, используемых клетками для селективного изменения конформации определенных белков. Это аллостерическая и ковалентная модуляция.

Прежде всего, обсудим аллостерическую модуляцию. При связывании лиганда с белком силы, притягивающие лиганд к белку, изменяют его конформацию. Например, когда лиганд приближается к участку связывания, эти силы могут вызвать изменение формы поверхности участка связывания и придавать форму, наиболее соответствующую форме поверхности лиганда. Более того, изменение формы участка связывания приводит к изменению формы других областей белка. Таким образом, если белок содержит два участка связывания, нековалентное связывание лиганда с одним из участков может изменить форму второго участка связывания и характеристики связывания этого второго участка. Такое явление названо аллостерической модуляцией, а такие белки - аллостерическими.

Один участок связывания аллостерического белка, названный активным центром (функциональным центром), взаимодействует со своим лигандом и обеспечивает физиологическую активность белка. Однако для этого необходимо, чтобы предварительно другой участок связывания, названный регуляторным центром, соединился со своим лигандом и изменил форму активного центра. Лиганд, который связывается с регуляторным участком, называют модуляторной молекулой.

Таким образом, модуляторная молекула (иначе аллостерический или атопический модулятор) представляет собой лиганд, увеличивающий или уменьшающий действие (основного, или ортостерического) агониста или антагониста, соединяясь с другим (аллостерическим, или аллотопическим) местом на рецепторной макромолекуле, т.е. с регуляторным центром.

Среди аллостерических (аллотопических) модуляторов выделяют несколько видов.

1. Аллостерические (аллотопические) усилители (*allosteric enhancers*) - это модуляторы, которые усиливают аффинность ортостерических лигандов и/или эффективность агониста, не создавая никакого собственного эффекта.

2. Аллостерические (аллотопические) антагонисты - это модуляторы, которые уменьшают аффинность ортостерических лигандов и/или эффективность агонистов.

3. Аллостерические (аллотопические) агонисты, или аллостерические (аллотопические) активаторы - это лиганды, которые способны опосредовать активацию рецептора их собственным путем, связываясь с центром распознавания на макромолекуле рецептора, отличающийся от основного (ортостерического) участка связывания.

4. Нейтральные аллостерические (аллотопические) лиганды взаимодействуют с аллостерическим участком связывания без влияния на связывание или функции

ортостерических лигандов, но могут все еще блокировать действие других аллостерических модуляторов, которые действуют через тот же самый аллостерический участок связывания.

В некоторых аллостерических белках связывание молекулы модулятора с регуляторным центром обеспечивает включение, а в других - выключение активного центра. Кроме того, связывание модуляторной молекулы может уменьшать или увеличивать сродство активного центра к лиганду. Взаимодействие между регуляторными и активными центрами белка - это один из способов регуляции. Существует и другой способ, когда активные центры определенных белков могут влиять друг на друга. Обычно эти белки состоят более чем из одной полипептидной цепи, соединенной вместе благодаря электрическому притяжению между отдельными цепями. При этом на каждой цепи может быть только один связывающий участок, служащий активным центром. Однако связывание лиганда с активным центром одной из цепей может приводить к изменению активных центров, расположенных на других цепях. Явление взаимодействия между активными центрами в мультимерном белке (т.е. в белке, содержащем более чем одну полипептидную цепь) называют кооперативностью. Кооперативность может обеспечивать прогрессивное увеличение аффинности для связываемого лиганда по мере того, как все большее количество участков белка связывают лиганд.

Синтопическое взаимодействие (*syntopic interaction*) - это взаимодействие между лигандами, которые связываются с тем же самым центром распознавания или с местами распознавания, которые перекрываются, на рецепторной макромолекуле. Этот термин чаще всего применяют при описании конкурентоспособных взаимодействий между лигандами, которые связываются с основным (ортостерическим) участком связывания на рецепторе. Но синтопическое взаимодействие может также происходить между различными лигандами, совместно использующими одинаковый центр распознавания (например, общий аллостерический центр) где-нибудь на макромолекуле рецептора.

Аллостерическое (аллотопическое) взаимодействие - это взаимодействие между лигандами, которые связываются с отличающимися неперекрывающимися местами распознавания на макромолекуле рецептора. Термины «синтопический» и «аллотопический» рекомендованы для того, чтобы различать взаимодействия, происходящие в общем (том же самом) месте, по сравнению с взаимодействием между различными местами соответственно. Термин «аллотопический» может быть использован равноценно с термином «аллостерический» при описании перекрестного взаимодействия между различными участками на макромолекуле рецептора. Термин «синтопический» должен быть ограничен, определяя взаимодействия в общем (том же самом) месте, и не должен использоваться заменяемо с термином «ортостерический». Последний термин относится только к основному месту распознавания на рецепторе (месту связывания эндогенного агониста).

Аллостерический переход (*allosteric transition*) - это изомеризация макромолекулы рецептора с большим числом конформационных состояний. Различные авторы использовали термин «аллостерический» в различных ситуациях. Первое общее применение термина должно описать любой механизм, включающий изомеризацию рецептора с двумя или более конформационными состояниями, каждое из которых может иметь различную аффинность к данному лиганду. Второе общее использование термина должно описывать взаимодействие между двумя топографически отличающимися местами распознавания на макромолекуле рецептора в данном конформационном состоянии. Чтобы применять оба варианта использования терминов, рекомендуют, чтобы термин «аллостерический переход» применяли при описании механизмов изомеризации рецептора. Термин «аллостерическое (или аллотопическое) взаимодействие» необходимо использовать при описании перекрестного взаимодействия между лигандами,

связывающимися с неперекрывающимися местами распознавания на макромолекуле рецептора.

Ковалентная модуляция - это второй способ изменить форму и, таким образом, активность белка. Ковалентная модуляция заключается в ковалентном присоединении заряженных химических групп к некоторым боковым остаткам аминокислот полипептидной цепи. В русскоязычной литературе это явление обычно называется «ковалентной модификацией».

В большинстве случаев к белку с помощью реакции фосфорилирования ковалентно прикрепляется фосфатная группа, несущая отрицательный заряд. В этом случае фосфатная группа переносится с одной молекулы на другую. Фосфорилирование одного из боковых остатков определенной аминокислоты в белке приводит к появлению в этой области отрицательного заряда, который обеспечивает изменение его конформации. Если изменение конформации влияет на участок связывания, это приводит к изменению свойств участка связывания. Хотя такой механизм значительно отличается от описанного выше, эффекты, производимые ковалентной модуляцией, подобны эффектам аллостерической модуляции. То есть при ковалентной модуляции функциональный участок связывания может быть включен или выключен либо может быть изменена его аффинность для лиганда. Напомним, что в отличие от аллостерической модуляции, которая обеспечивается нековалентным связыванием модуляторной молекулы, ковалентная модуляция требует химической реакции, в которой образуется ковалентная связь.

Химический синапс

Химический синапс выполняет задачу передачи электрического сигнала от пресинаптического нейрона на постсинаптическую клетку. Для этого существует комплекс механизмов, которые в ответ на изменение потенциала мембраны в пресинаптической клетке приводят к изменению потенциала мембраны постсинаптической клетки. Итак, электрический сигнал пришел на пресинаптическую мембрану и вызвал ее деполяризацию. В результате этого произошло освобождение из везикул пресинаптической зоны специфических переносчиков, называемых нейротрансмиттерами, или медиаторами. Эти химические соединения диффундируют к постсинаптической области и открывают на постсинаптической мембране ионные каналы. Так как потенциал покоя мембраны каждой клетки определяется равновесием между различными ионными токами, оно может нарушаться, если определенный вид ионов вдруг начнет усиленно диффундировать через клеточную мембрану по электрохимическому градиенту. Если, например, мембрана клетки станет проницаемой для ионов Na^+ , то эти ионы по электрохимическому градиенту начнут входить в клетку. В результате происходит деполяризация мембраны клетки. Именно это и происходит на постсинаптической мембране, в чем заключается важный принцип: изменение возможности проводимости определенных ионов через постсинаптическую мембрану служит основой функции химических синапсов. Ионные токи изменяют потенциал мембраны постсинаптической клетки, поэтому такие изменения потенциала называют постсинаптическими потенциалами. Так как в формировании потенциала покоя мембраны участвует большое число ионов, равновесие может нарушаться посредством изменений проводимости различных ионов. Так, например, при дополнительном выходящем токе ионов K^+ или при входящем токе ионов Cl^- может происходить гиперполяризация, которая является противоположностью возбуждения. Т.е. определенные химические процессы на постсинаптической мембране могут посредством гиперполяризации вызывать и торможение нейрона. В этой возможности можно видеть существенное эволюционное преимущество химических синапсов.

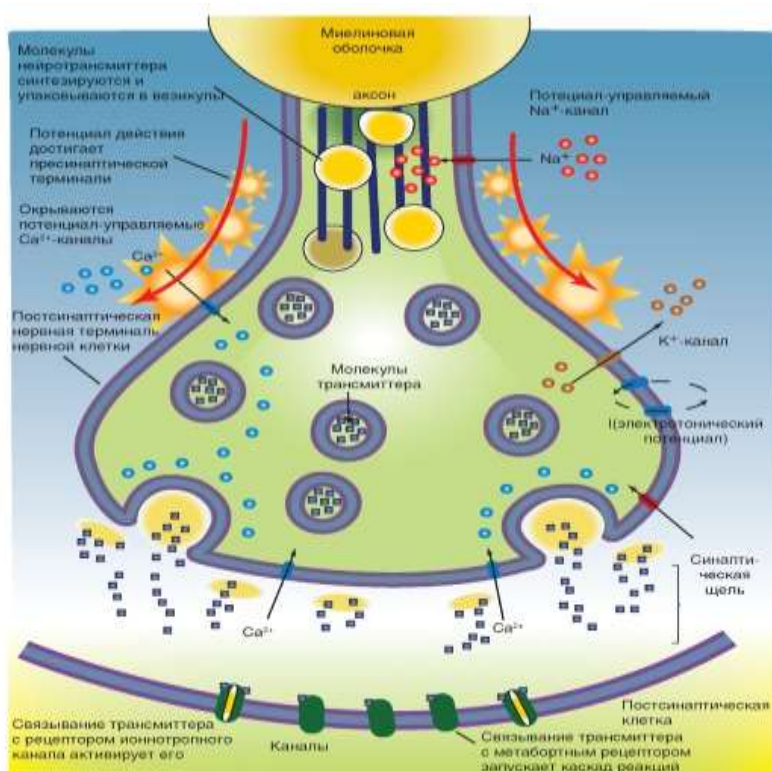
Совершенно очевидно, что представленные химические процессы могут быть модифицированы посредством других химических веществ. Это происходит при помощи независимых соединений - нейромодуляторов.

С другой стороны, химические процессы в синапсе открывают широкие возможности для фармакологической регуляции и оказываются предметом многочисленных исследований с целью поиска эндогенных соединений, способных модифицировать в заданных направлениях синаптическую передачу. И действительно, многие медикаменты реализуют свое фармакологическое действие путем влияния на синаптическое проведение. Это относится не только к психотропным и наркотическим веществам. Многие другие, например, (гипотензивные) средства понижающие артериальное давление, также действуют опосредованно через синапсы. Кроме того, многие яды растительного и животного происхождения направлены действуют на химический синапс.

Необходимо подчеркнуть, что нейротрансмиттеры, наряду с их прямыми задачами, имеют также большое значение в передаче информации: во время нейроонтогенеза (зародышевого и раннего развития до года) они играют важнейшую роль при образовании связей в церебральных структурах. Так как большинство соединений с наркотическим действием влияет на функцию нейротрансмиттеров, то их потребление в том или ином виде матерью во время беременности или грудного вскармливания имеет негативные последствия для нейроонтогенеза ребенка.

Почти все синаптические терминали освобождают не один транзиттер, но одновременно с ним целый ряд биологически активных соединений. Примерами таких сопутствующих соединений служат АТФ, ГТФ, окситоцин, вещество Р, энкефалин и др. Их называют котрансмиттеры. Многие транзиттеры, например, глицин и ГАМК или глицин и глутамат могут присутствовать в везикулах одновременно. Котрансмиттеры могут модулировать синаптические процессы. Накапливаясь в везикулах, они обладают собственной кинетикой освобождения, например освобождение только при значительной величине пресинаптического потенциала.

Рис. 3-6. Химический синапс и принцип его работы



Аксональный транспорт

Мембранные и цитоплазматические компоненты, которые образуются в биосинтезирующем аппарате сомы и проксимальной части дендритов, должны распределяться по аксону (особенно важно их поступление в пресинаптические структуры синапсов), чтобы восполнить потерю элементов, подвергшихся высвобождению или инактивации. Однако многие аксоны слишком длинны, чтобы материалы могли эффективно перемещаться из сомы к синаптическим окончаниям путем простой диффузии. Эту задачу выполняет особый механизм - аксональный транспорт.

Существуют несколько типов аксонального транспорта. Окруженные мембранами органоиды и митохондрии транспортируются с относительно большой скоростью посредством быстрого аксонального транспорта. Вещества, растворенные в цитоплазме (например, белки), перемещаются с помощью медленного аксонального транспорта. У млекопитающих быстрый аксональный транспорт имеет скорость 400 мм/сутки, а медленный аксональный транспорт - около 1 мм/сутки. Синаптические пузырьки могут передвигаться с помощью быстрого транспорта из сомы мотонейрона спинного мозга человека к нервно-мышечному соединению стопы примерно за 2,5 суток. Сравним: доставка на такое же расстояние многих растворимых белков происходит примерно за 3 года.

Для аксонального транспорта требуется затрата метаболической энергии и присутствие внутриклеточного Ca^{2+} . Элементы цитоскелета (точнее, микротрубочки) создают систему направляющих тяжей, вдоль которых передвигаются окруженные мембранами органоиды (рис. 3.7). Эти органоиды прикрепляются к микротрубочкам аналогично тому, как это происходит между толстыми и тонкими филаментами волокон скелетных мышц; движение органоидов вдоль микротрубочек запускается ионами Ca^{2+} .

Аксональный транспорт осуществляется в двух направлениях. Транспорт от сомы к аксональным терминалям, называемый антероградным аксональным транспортом, восполняет в пресинаптических окончаниях запас синаптических пузырьков и ферментов, ответственных за синтез нейромедиатора. Транспорт в противоположном направлении - ретроградный аксональный транспорт, возвращает опустошенные синаптические пузырьки в сому, где эти мембранные структуры деградируются лизосомами.

Высокая, в ряде случаев, потребность в молекулах трансммиттера вызывает, как правило, синтез трансммиттера на месте, то есть непосредственно в пресинаптическом окончании. Разумеется, необходимые для синтеза ферменты синтезируются в теле и при помощи аксонального транспорта доставляются в синаптические окончания. Поскольку пути синтеза трансммиттера зависят от вида, рассмотрим их на примере обсуждаемого выше холинэргического синапса. Другие трансммиттерные вещества имеют, разумеется, свои собственные пути синтеза.

АЦХ образуется с помощью холин-ацетилтрансферазы путем ацетилирования холина, причем остаток уксусной кислоты образуется из ацетилкоэнзима-А. Холин широко распространен в организме и включается в нервное окончание при помощи двух различных механизмов транспорта, из которых один обладает очень высоким сродством (так называемый высокоаффинный захват). Этот путь блокируется при помощи гемихолина. Если нервное окончание деполяризовано (активировано), то захват холина ускоряется. АЦХ, синтезированный в цитоплазме, активно транспортируется и накапливается в синаптических везикулах. Это приводит к очень высокой концентрации АЦХ от 0.2 М до 0.6 М, что соответствует нескольким тысячам молекул на везикулу. В целом можно сказать, что низкомолекулярные трансммиттеры накапливаются в маленьких (40-50 нм) электронно-оптически прозрачных везикулах, тогда как большие (>70 нм) электронно-оптически плотные везикулы содержат белки и пептиды. Эти соединения

образуются не в пресинаптическом окончании, а в теле клетки и попадают при помощи аксонального транспорта в пресинаптическое окончание.

Теперь необходимо отметить, что хотя синапсы называются на основании названия их главного транмисмиттера (например, холинэргический), почти все синаптические терминалы освобождают не только один единственный транмисмиттер, но одновременно с ним целый ряд биологически активных соединений - ко-транмисмиттеров. Примерами таких сопутствующих соединений являются АТФ, ГТФ, окситоцин, вещество Р, энкефалин, и другие. Ко-транмисмиттеры могут модулировать синаптический процесс.

Рис. 3-7. Синтез и рецикл синаптических везикул и их содержимого.

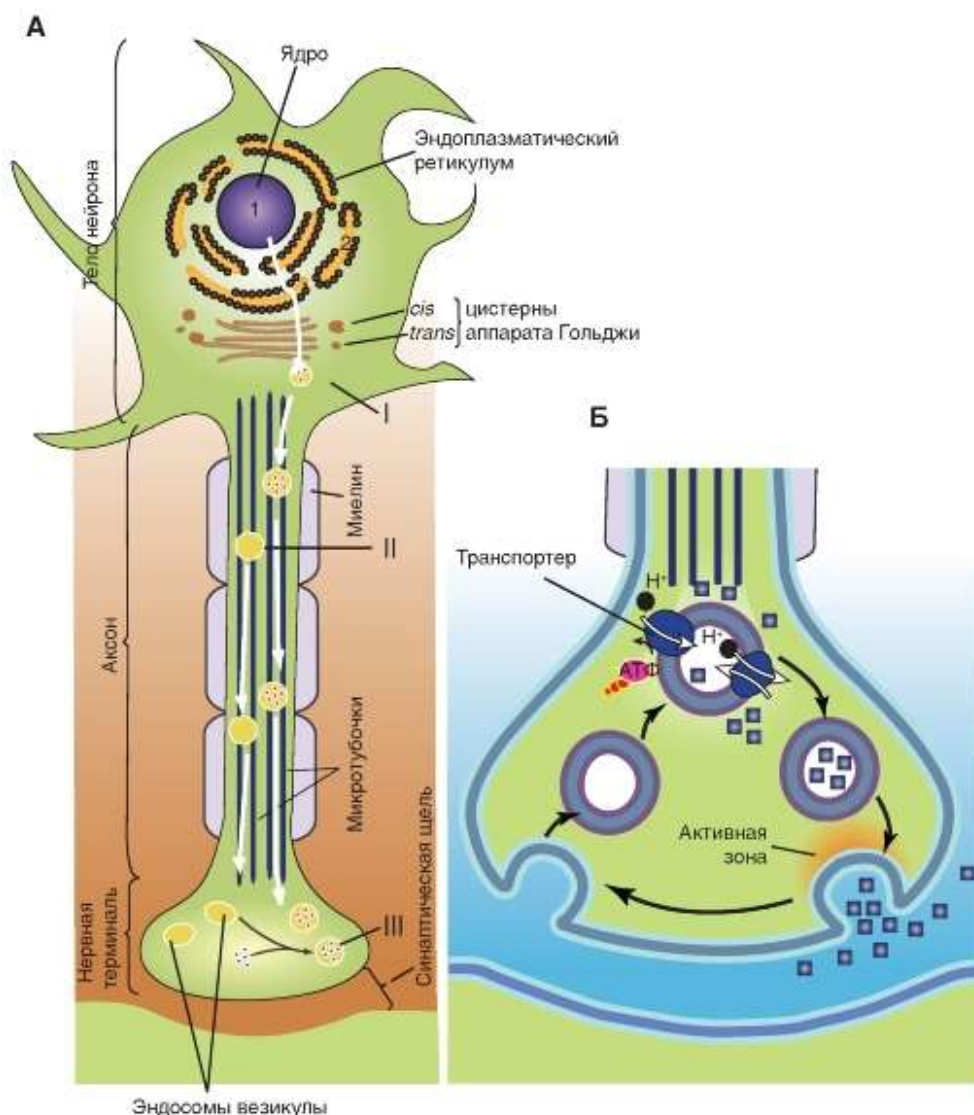
А - Биосинтез нейротрансмиттеров.

I. Везикулы, предшественники пептидных транмисмиттеров и ферменты синтезируются в теле нейрона и высвобождаются из аппарата Гольджи.

II. Везикулы перемещаются по аксону с помощью быстрого аксонального транспорта. Пептидные транмисмиттеры уже заключены в некоторые везикулы.

III. Непептидные нейротрансмиттеры синтезируются и транспортируются в везикулы непосредственно в нервных окончаниях

Б - Экзоцитоз (высвобождение везикул с медиатором)



Механизм высвобождения трансммиттера

Серия потенциалов действия «пробегают» вдоль аксона, достигает нервного окончания и деполяризует пресинаптическую зону. Во время этой деполяризации в нервном окончании возникает не только входящий ток Na^+ , как это происходит в мембране по всей длине аксона. Мембрана окончания аксона имеет и потенциал-управляемые Ca^{2+} -каналы, через которые во время деполяризации, вызванной пришедшим потенциалом действия, ионы Ca^{2+} проникают в синаптическое окончание. В состоянии покоя очень низкая концентрация Ca^{2+} (приблизительно 10^{-7} М) повышается на несколько порядков. Одновременно ионы Ca^{2+} дополнительно выходят из эндоплазматического ретикулаума. В каждом случае требуется некоторое время (приблизительно 0,2 мс), прежде чем цитоплазматический уровень свободного кальция (кальциевое зеркало) достигнет необходимых действенных концентраций. В синаптическом окончании в зоне пресинаптической мембраны расположено большое число синаптических пузырьков (везикул). Их мембраны, подобно клеточной мембране, состоят из фосфолипидного бислоя и белков. Эти везикулы заполнены жидкостью, в составе которой содержится химическое вещество - трансммиттер, благодаря которому осуществляется синаптическая передача. Трансммиттер «переносит» возбуждение от пресинаптической мембраны на постсинаптическую мембрану, откуда и берется его название.

Синаптические везикулы фиксируются большей частью к цитоскелету посредством протеина синапсина (*synapsin*), локализованного на цитоплазматической поверхности каждой везикулы, к протеину спектрину (*spectrin*), расположенному на волокнах F-актина цитоскелета, образуя тем самым трансммиттерный резервуар. Меньшая часть везикул также связана с внутренней стороной пресинаптической мембраны с помощью специфических протеинов. Это взаимодействие осуществляется посредством белка мембраны везикулы - синаптобревина (*synaptobrevin*) и белка пресинаптической мембраны синтаксина (*syntaxin*). Именно эти везикулы непосредственно поставляют трансммиттер для очередного выброса.

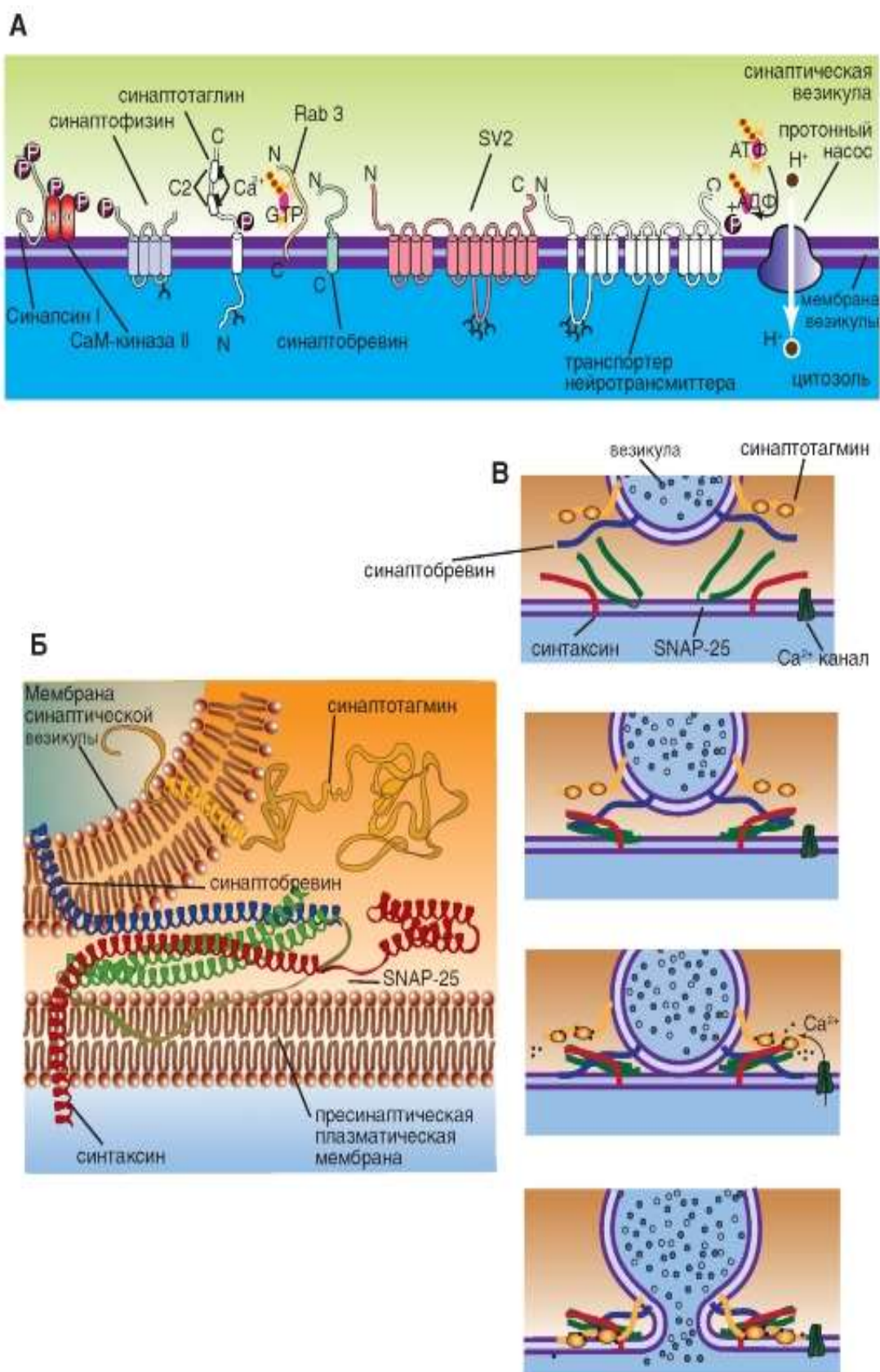
Если потенциал действия достиг пресинаптической области, и в пресинаптическом окончании концентрация Ca^{2+} поднялась до необходимого уровня, то происходят два процесса. Во-первых, на уже связанных с пресинаптической мембраной везикулах, по существу, лежащих на ней, Ca^{2+} связывается с протеином, входящим в мембрану везикулы - синаптотагмином (*synaptotagmin*). Это приводит к тому, что мембрана везикулы раскрывается. Одновременно комплекс полипептида, называемого синаптофизин (*synaptophysin*), сливается с неидентифицированными протеинами пресинаптической мембраны. При этом возникает пора, через которую осуществляется регулируемый экзоцитоз, т.е. секреция трансммиттера в синаптическую щель, причем этот процесс регулирует еще один протеин везикулы - rab3A. В одной везикуле сосредоточено примерно 6000-8000 молекул трансммиттера, и это именно то наименьшее количество трансммиттера, освобожденного в синаптическую щель, которое называется 1 квант трансммиттера. В совокупности локальная концентрация трансммиттера в синаптической щели после его освобождения относительно высока и лежит в миллимолярном диапазоне.

Во-вторых, повышенный уровень ионов Ca^{2+} в пресинаптическом окончании активирует Ca^{2+} -кальмодулин-зависимую протеинкиназу II (CaM-киназа II). В пресинаптическом окончании этот фермент фосфорилирует синапсин. После этого нагруженные трансммиттером везикулы освобождаются от цитоскелета и перемещаются на пресинаптическую мембрану для осуществления дальнейшего цикла.

Рис. 3-8. Высвобождение трансммиттеров.

А - белки, встроенные в мембрану везикулы. Б - взаимодействие везикулярных белков и белков пресинаптической мембраны. В - механизм высвобождения транмиссера из везикулы.

Б - экзоцитоз (высвобождение везикул с медиатором)



Преобразование трансммиттера

Трансммиттер может быть либо быстро химически расщеплен на неактивные компоненты, либо удален из синаптической щели путем высокоселективного обратного захвата в пресинаптическое окончание. В центральной нервной системе клетки глии могут также захватывать трансммиттер. Кроме того, на возбуждающих глутаматергических синапсах синаптическая область плотно покрыта отростками астроцитов. Какой из инактивирующих механизмов играет в синапсе большую роль - зависит от типа синапса.

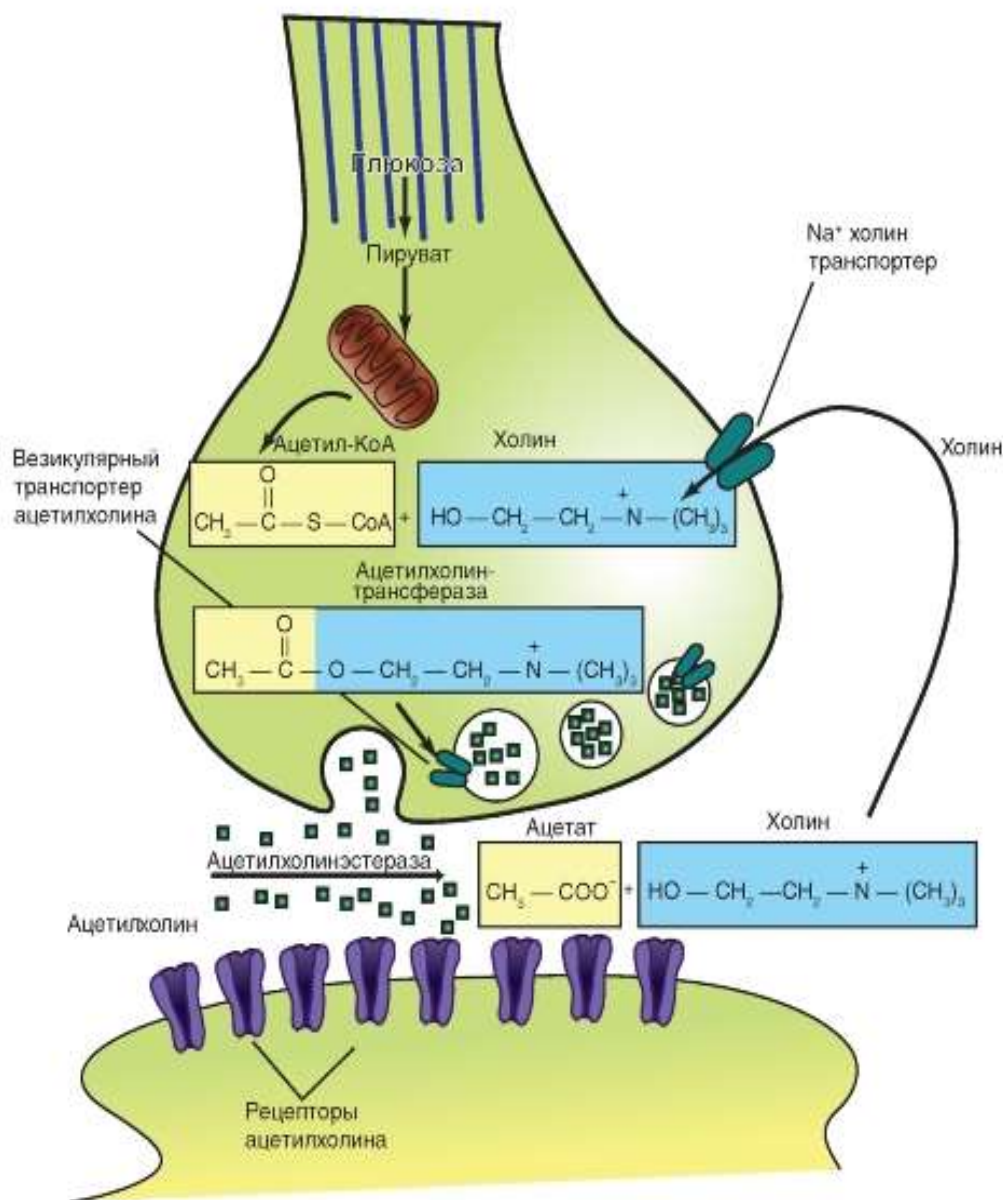
Так, АЦХ, исключительно быстро гидролизруется АЦХ-эстеразой. Возникают ацетат (остаток ацетила) и холин. Последний, благодаря высокоспецифичному механизму транспорта, опять захватывается пресинаптическим окончанием и вновь используется для образования АЦХ. На этом уровне возможна фармакологическая регуляция холинергических синапсов. АЦХ-эстеразу можно ингибировать рядом соединений, например эзерином (*physostigmin*). Продолжительность постсинаптического действия выброшенного АЦХ при этом удлиняется. Терапевтически это используется в тех случаях, когда для устранения мышечной релаксации после наркоза конкурентные блокаторы типа кураре хотят вытеснить с помощью высокой концентрации АЦХ. Таким способом можно очень быстро восстановить мышечный тонус.

Пресинаптические окончания благодаря описанному механизму обратного захвата (реаптейка) захватывают и возвращают либо фрагменты трансммиттера (например, холин), либо всю молекулу трансммиттера (например, серотонин). Для этого в пресинаптической мембране находятся специфические протеины - транспортеры. Данный механизм обратного захвата фрагментов или всей молекулы трансммиттера, в свою очередь, может находиться опять под влиянием многих синапсов. Ряд психофармакологических веществ используют этот синаптический механизм в качестве мишени. Так, например, антидепрессант имипрамин блокирует обратный захват катехоламинов адренергическими синапсами. Тем самым повышается эффективность действия трансммиттера. Группа таких веществ называется ингибиторами обратного захвата, их часто применяют в психофармакологии.

Мембрана везикулы после освобождения трансммиттера также рециклируется. Она эндцитотически поступает в пресинаптическое окончание и используется для вновь образуемого связывания везикул.

Во многих синапсах рецепторы для трансммиттера есть не только в постсинаптической мембране, но также и в пресинаптической. Это так называемые ауторецепторы. В зависимости от типа синапса, при взаимодействии с ними трансммиттера его высвобождение либо усиливается, либо прекращается (позитивное или негативная обратная связь). На ауторецепторы может оказывать влияние также входящий ток Ca^{2+} в пресинаптическом окончании.

Рис. 3-9. Расщепление, удаление и обратный захват трансммиттера на примере ацетилхолина



Типы химических синапсов

У части синапсов ионный канал, который при действии лиганда, т.е. благодаря связыванию с молекулой трансммиттера, открывается (каналы, управляемые лигандами), называется ионотропным рецептором (рис. 3-10 А).

Рецепторы, в которых открытие ионного канала связано с подключением других химических процессов, называют метаботропными рецепторами. На метаботропных рецепторах лиганд открывает ионный канал не прямо, а опосредованно, через вторичные мессенджеры (рис. 3-10 Б). У большинства синапсов рецепторный белок не представляет собой ионный канал, но при связывании с ним молекул трансммиттера возникает каскад химических реакций, в результате которых соседствующие ионные каналы открываются при помощи вторичных мессенджеров. Речь идет о метаботропных рецепторах.

Хорошим примером и ионотропного, и метаботропного синапса служит холинергический синапс, у которого трансммиттером служит АЦХ. У холинергических синапсов два типа рецепторов: АЦХ-рецепторы, чувствительные дополнительно к

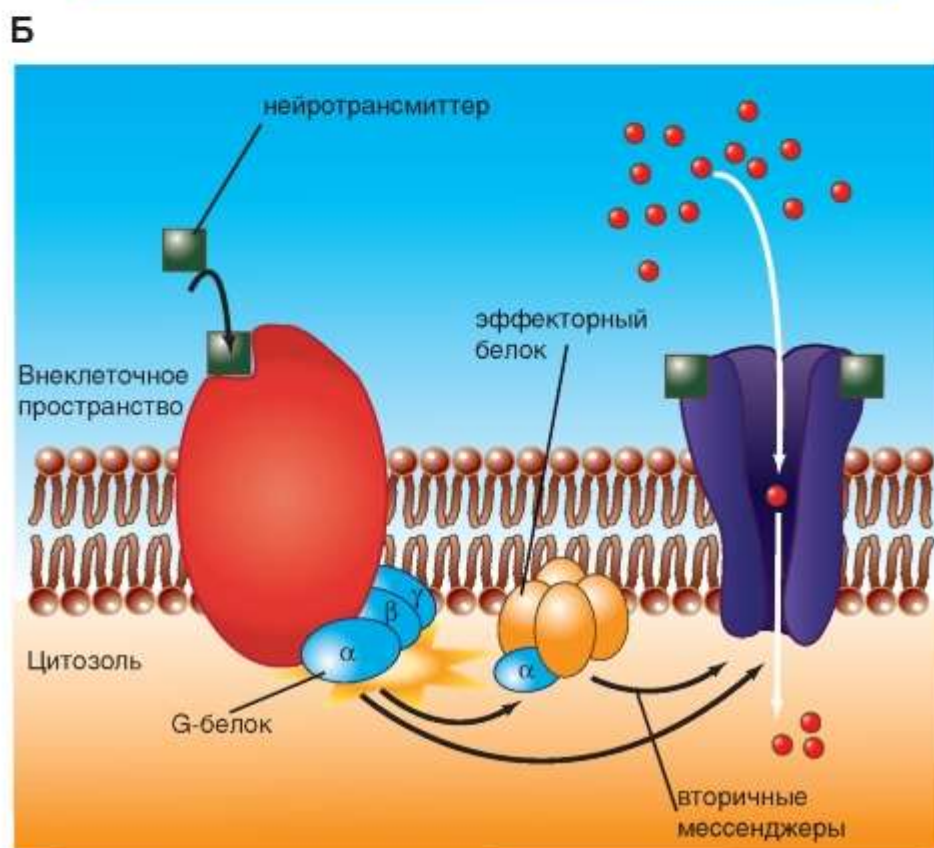
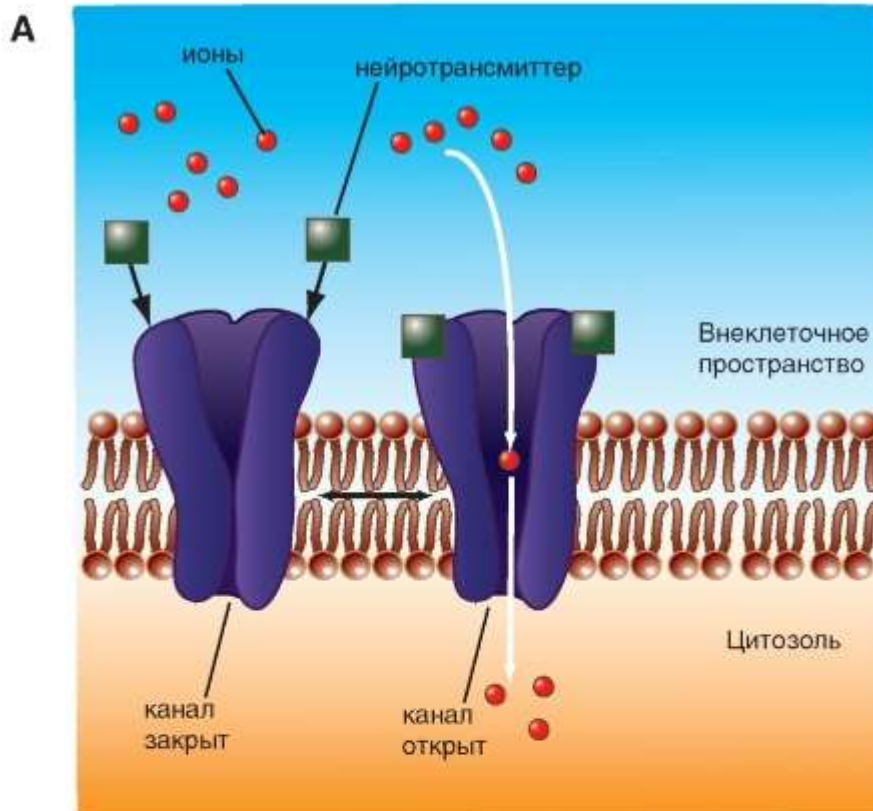
никотину (никотиновый АЦХ-рецептор), и АЦХ-рецепторы, чувствительные дополнительно к мускарину (мускариновый АЦХ-рецептор). Первый является ионотропным, второй - метаботропным.

У мускариновых синапсов и место связывания с трансмиссером, и ионный канал локализованы не в самом трансмембранном белке. Эти рецепторы связаны непосредственно с G-белком. Такая структура дает дополнительные возможности для влияния на функцию синапсов. С одной стороны, для таких рецепторов также существуют конкурентные блокаторы. У мускариновых синапсов это, например, атропин, - алкалоид, содержащийся в растениях семейства пасленовых. Очевидно, что синаптическая передача, в которой используются такие механизмы, очень медленная. До изменения проводимости мембраны должны произойти многие химические реакции. Время передачи лежит в диапазоне от 100 мс. К мускариновым синапсам относятся постганглионарные, парасимпатические и ауторецепторы центральной нервной системы. Мускариновые рецепторы, образованные от аксонов маутнеровских клеток *nucleus basalis* (*Meynert cells*), управляют особыми процессами обучения.

Таблица 3-1. Перечень соединений, влияющие на никотиновые, мускариновые и холинергические синапсы

	Никотиновые синапсы	Мускариновые синапсы
Тип рецептора	N_1 , N_2 ; многие подтипы	m_1 – m_5
Эффектор	N_1 периферические синапсы N_2 преганглионарные в автономных ганглиях, ЦНС	Постганглионарный Пресимпатический, ЦНС Ауторецепторы
Синтез трансмиссера	Вещества, неспецифически тормозящие холинацетил-трансферазы Гемихолин тормозит обратный захват холина → Освобождение накопленного	
Освобождение трансмиссера		
Усиливает	β -Бунгаротоксин (яд змеи)	Специфические вещества неизвестны
Ослабляет	Ботулинический токсин, Mg^{2+}	Mg^{2+}
Связывание с постсинаптическим рецептором		
Агонисты – холиномиметики	Никотин (N_1 , N_2) N_1 : сукинилхолин периферические синапсы; Декаметон Блок деполяризации	Мускарин, Метахолин Окситреморин Пилокарпин
Антагонисты: конкурентные блокаторы	N_1 : α -бунгаротоксин (яд змеи) N_1 : д-тубокурарин-периферический синапс; Галламин-миорелаксация	Атропин Скополамин Пирепенин (M1)
неконкурентные блокаторы	N_2 : Гексаметоний — автономные ганглии Специфические вещества неизвестны	Хинидин (сердце)
Расщепление АЦХ	При помощи АЦХ-эстеразы [блокаторы	эзерин, Е605, зарин, такрин (в ЦНС)]

Рис. 3-10. Ионотропные и метаботропные синапсы



Типы транмиттеров и механизмы их действия

Ацетилхолин. Является медиатором для всех двигательных нейронов, многих интернейронов ЦНС, а также нейронов парасимпатической нервной системы. Существует 2 типа рецепторов ацетилхолина: АЦХ-рецепторы, чувствительные дополнительно к

никотину: никотиновый АЦХрецептор и, соответственно, никотиновый АЦХ (нАЦХ) синапс, и АЦХ-рецепторы, чувствительные дополнительно к мускарину - мускариновый АЦХ-рецептор и, соответственно, мускариновый (мАЦХ) АЦХ синапс. АЦХ синапс с никотиновым рецептором являются ионотропными, а АЦХ синапсы с мускариновым рецептором являются метаботропными.

Глутамат в синапсах выполняет функцию трансммиттера и ко-трансммиттерами (может присутствовать одновременно с другими трансмиттерами, например с глицином). Глутамат в мозге является важнейшим трансмиттером для возбуждающих синапсов. Синапсы, использующие в качестве трансмиттера глутамат, находятся приблизительно на 50% нейронов центральной нервной системы. Такие синапсы образуют важнейшие возбуждающие входы систем мозга к коре большого мозга. Они принимают участие в процессах обучения. Глутамат прямо открывает неспецифический ионный канал для катионов.

Глицин служит трансмиттером тормозных синапсов и действует как нейромодулятор. Глицин предназначен для выполнения специфических ингибиторных задач. Большинство клеток Реншоу, через которые тормозятся α -мотонейроны спинного мозга, выбрасывают глицин. Глициновые рецепторы открывают каналы для ионов Cl^- , что способствует возникновению так называемых тормозных постсинаптических потенциалов (тормозных потенциалов синаптической пластинки - ТПСП). Синаптическое действие заканчивается с помощью механизма обратного захвата глицина.

В центральной нервной системе глицин играет также и роль нейромодулятора, например, в гиппокампе NMDA-рецепторы, описанные в предыдущем разделе, испытывают модулирующее влияние со стороны глицина.

γ -Аминомасляную кислоту выбрасывают в качестве трансмиттера многие тормозные интернейроны, имеющиеся практически во всех отделах центральной нервной системы, и аксоны клеток Пуркинье мозжечка. ГАМК оказывает тормозное действие на постсинаптические структуры. Существует по меньшей мере два различных постсинаптических механизма, которые запускаются благодаря различным рецепторам (ГАМК_A и ГАМК_C с одной стороны; ГАМК_B с другой стороны). Серотонин (5-*hydroxytryptamin*) - биогенный амин, широко распространенный в ЦНС. В мозге его особенно много в области тектума. Оттуда наблюдается много проекций в лимбическую систему, к таламусу и гипоталамусу, в передний мозг, в мозжечок и в спинной мозг. По этим путям, очевидно, осуществляется контроль многих нейрональных функций.

На постсинаптической мембране были обнаружены различные серотониновые рецепторы, которые большей частью, благодаря вторичным мессенджерам, открывают каналы для ионов K^+ и Ca^{2+} . Действие трансмиттера заканчивается включением механизма обратного захвата пресинаптической областью.

Гистамин - моноамин, выступающий в качестве трансмиттера. Особенно важную роль он играет как модулятор в мозге грудных детей. Гистаминергические нейроны у взрослых находятся в заднем гипоталамусе и связаны со многими участками мозга, где они оказывают влияние на состояние бодрствования, мышечную активность, прием пищи, сексуальные отношения и обменные процессы в мозге. Из-за участия этих нейронов в регуляции процессов сна и бодрствования многие антигистаминные препараты вызывают состояние сонливости.

Дофамин - биогенный амин, наиболее представленный в базальных ганглиях, где нейроны черной субстанции образуют дофаминергический путь к стриатуму, выполняя функцию контроля моторики.

Дофаминергические пути, которые исходят от *area ventralis tegmentalis* и проецируются к *nucleus accumbens*, играют большую роль в патогенезе эпилепсии.

Существуют различные дофаминовые рецепторы, действующие через вторичные мессенджеры. Их постсинаптическое действие может быть тормозным или возбуждающим. Дофамин очень быстро захватывается обратно из синаптической щели в пресинаптическое окончание. Там он претерпевает превращения благодаря моноаминоксидазе. Вне нейрона, он подвергается воздействию катехол-О-метилтрансферазы.

Норадреналин катехоламин, выполняющий функцию трансммиттера в ЦНС и синтезирующийся прежде всего нейронами *locus coeruleus*. Это ядро состоит не более чем из 1000 клеток, аксоны которых так многократно разветвляются, что можно найти адренергические окончания во многих областях ЦНС. Они оказывают модулирующее влияние, например, на процессы созревания, обучения, переработку информации в мозгу, регуляцию сна и на эндогенное торможение боли. В периферической нервной системе норадреналин служит важным трансммиттером симпатических постганглионарных окончаний, например, на сердце и на гладких мышцах сосудов. В некоторых центральных синапсах как трансммиттер рассматривают адреналин.

Для катехоламинов существует четыре главных типа рецепторов: α_1 , α_2 , β_1 и β_2 . Они отличаются по реакции на различные агонисты или антагонисты, а также по постсинаптическим эффектам. Рецепторы α_1 управляют Ca^{2+} -каналами при помощи вторичного мессенджера IP_3 и при активации повышают внутриклеточную концентрацию ионов Ca^{2+} . Активация рецепторов ведет к уменьшению концентрации вторичного мессенджера цАМФ, вызывая различные эффекты. Активация рецепторов β , например, на клетках Пуркиньи мозжечка, повышает при помощи вторичного мессенджера цАМФ проводимость мембраны для ионов K^+ и, таким образом, образует ТПСР. Обратный захват и разрушение похожи на таковые для дофамина

Олигопептиды, которые действуют как трансммиттеры или нейромодуляторы - это преимущественно короткие полипептиды, состоящие из 2-30 аминокислотных остатков. Они функционируют как трансммиттеры или ко-трансммиттеры либо модулируют синаптические процессы. Так энкефалин, эндорфин и динарфин служат трансммиттерами в тех синапсах, в которых опиоидные вещества также оказывают действие. Опиоиды (например, морфин) являются сильными анальгетиками. Вышеназванные опиоидные пептиды тормозят распространение боли в спинном мозге. Кроме того, они играют большую роль в лимбической, автономной и моторной системах.

Другие нейропептиды: вещество Р, ангиотензин II, соматостатин, вазоактивный интестинальный полипептид (VIP), нейропептид Y и многие другие. Большинство названных веществ были открыты в качестве гормонов прежде, чем была определена их роль в синаптическом переносе.

Таблица 3-2. Примеры механизмов действия трансммиттеров на различные типы рецепторов

Трансмиттер	Тип рецептора	Действие на:
Ацетилхолин	N ₁ (мышечный тип)	Лиганд-управляемый катионный канал
	N ₂ (нейронный тип)	IP ₃ /DAG
	m ₁ , m ₃ , m ₅	G _i -ГТФ, G _K ↑
	m ₂	
Глутамат	NMDA, AMPA	Лиганд-управляемый катионный канал
	MGluR ₁₋₅	IP ₃ /DAG
Глицин	GlyR	Анионный канал
ГАМК	ГАМК _A , ГАМК _C	Cl ⁻ -канал
	ГАМК _B	пАМФ ↑, G _K ↑, Ca ²⁺ ↑
Серотонин	5-HT ₁	пАМФ ↓
	5-HT ₂	IP ₃ /DAG
	5-HT ₃	Лиганд-управляемый катионный канал
	5-HT ₄₋₇	пАМФ ↑
Дофамин	D ₁	пАМФ ↑
	D ₂	пАМФ ↓
Норадреналин	α ₁	IP ₃ /DAG
	α ₂	пАМФ ↑, G _K ↑, Ca ²⁺ ↑
Адреналин	β ₁ , β ₂	пАМФ ↑
Опиоиды	μ, δ	пАМФ ↓, G _K ↑
	κ	Ca ²⁺ ↓

Типы ацетилхолиновых синапсов

Среди синапсов с химическим механизмом передачи электрического сигнала особое место занимает так называемый холинергический синапс, у которого медиатором служит АЦХ. Особенность этих синапсов заключается в том, что в организме присутствуют две их группы, подразделяющиеся по тому типу АЦХ-рецептора, который присутствует на постсинаптической мембране. Это АЦХ-рецепторы, чувствительные дополнительно к никотину (нАЦХ-рецептор и, соответственно, нАЦХ синапс), и АЦХ-рецепторы, чувствительные дополнительно к мускарину (мАЦХ-рецептор и, соответственно, мАЦХ синапс). АЦХ синапсы с никотиновым АЦХ-рецептором являются ионотропными, а АЦХ синапсы с мускариновым АЦХ-рецептором - метаботропными.

На примере ионотропного АЦХ синапса и метаботропного АЦХ синапса рассмотрим механизм проведения электрического сигнала. В противоположность синапсу с ионотропным рецептором (рис. 3-11 А), в котором трансмиттер непосредственно открывает ионный канал, у метаботропных рецепторов есть другие рецепторные белки, которые не являются ионными каналами (рис. 3-11 Б).

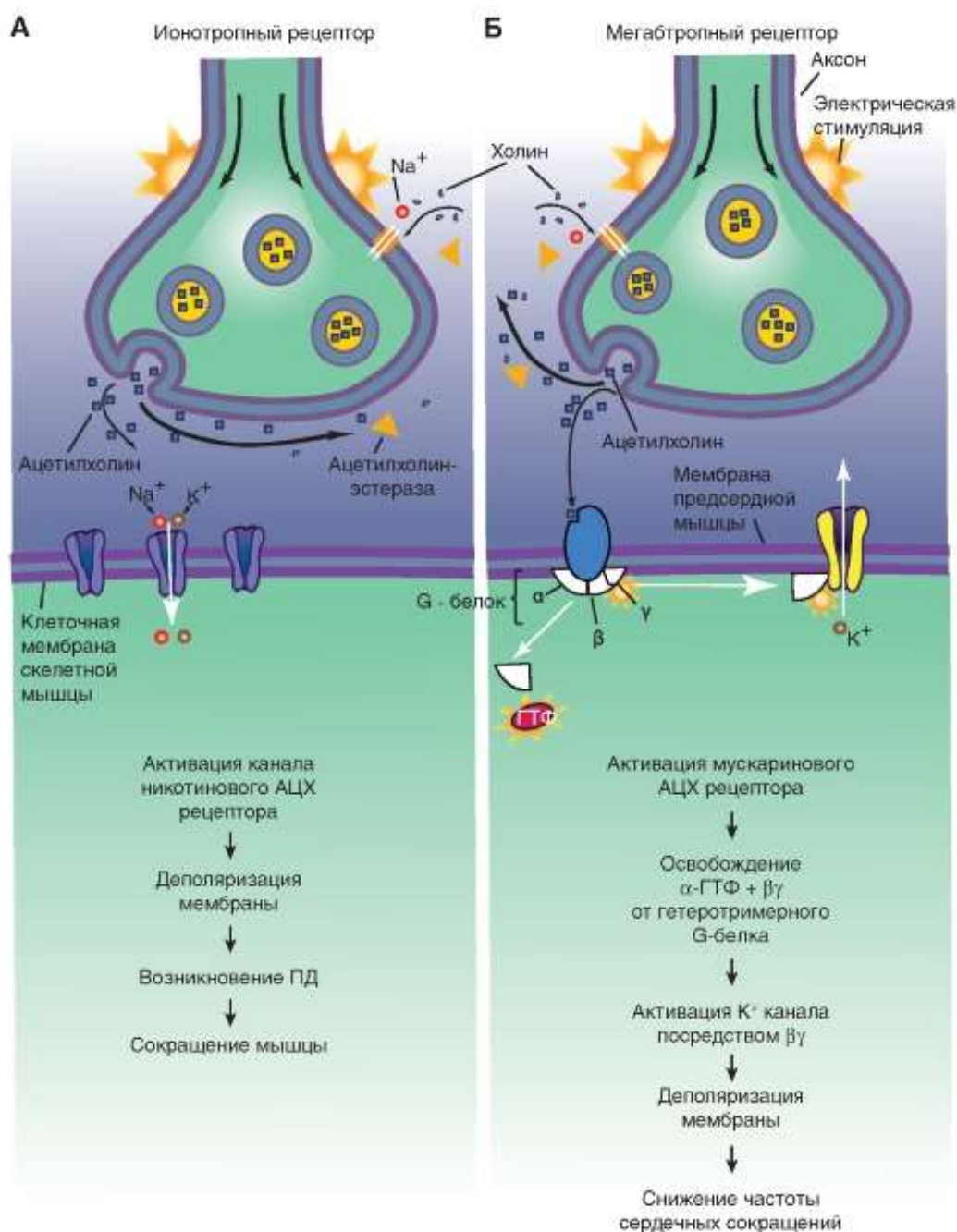
В ионотропном никотиновом АЦХ синапсе две молекулы свободного АЦХ связываются с рецепторным белком, представляющим собой одну из структур ионного канала, что вызывает сдвиг заряда внутри макромолекулы рецептора и как следствие аллостерическое изменение его формы и формы самого канала. Центральный канал расширяется, его внутренний диаметр становится приблизительно равным 0,65 нм. Благодаря этому центральный канал становится проницаемым для ионов натрия. Однако для анионов канал не проходим из-за имеющихся на внутренних стенках зарядов. Коротко: активация нАЦХ-канала вызывает проводимость постсинаптической мембраны для катионов, деполяризацию постсинаптической мембраны, формирование потенциала и, в итоге, сокращение мышцы.

В метаботропном мускариновом АЦХ синапсе АЦХ-рецептором служит белок, который не является ионным каналом. Он интересен в эволюционном аспекте, поскольку обладает большим химическим сходством со светочувствительным пигментом родопсином, α- и β- адренергическими и другими рецепторами. Ионные каналы, необходимые для возникновения потенциала на постсинаптической мембране, открываются там только благодаря процессам, определяемым вторичными посредниками. Как только трансмиттер связывается с рецептором, G-белок, имеющий три субъединицы, образует с рецептором комплекс. ГДФ, связанный с G-белком, заменяется на ГТФ. При этом образуется активированный G-белок, состоящий из ГТФ и α-субъединицы, который

открывает калиевый ионный канал. Этот пример демонстрирует, что агонист гиперполяризовал бы постсинаптическую клетку, и, значит, затормозил бы ее активность.

У вторичных мессенджеров есть много возможностей для осуществления влияния на ионные каналы. С помощью различных вторичных мессенджеров определенные ионные каналы могут открываться или закрываться. Наряду с описанным механизмом открытия канала с помощью активированной α -субъединицы G-белка у многих синапсов при помощи ГТФ может также активироваться β - и γ -субъединицы, например, в сердце. В других метаботропных синапсах могут играть роль другие вторичные мессенджеры. Так, ионные каналы могут открываться с помощью цАМФ/ IP_3 или с помощью фосфорилирования протеинкиназы С. Этот процесс также запускается G-белком, который активирует фосфолипазу С, что ведет к образованию IP_3 . Дополнительно увеличивается образование DAG и протеинкиназы.

Рис. 3-11. Механизмы работы ионотропного синапса (А) и метаботропного синапса (Б)



Ионотропный никотиновый холинергический синапс

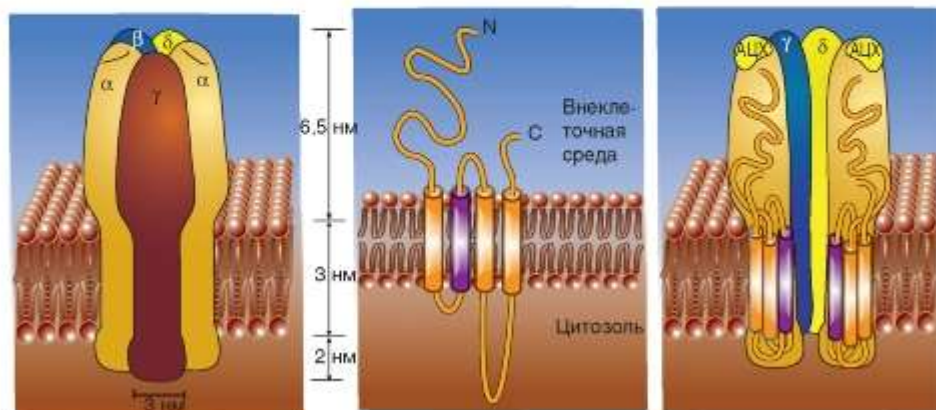
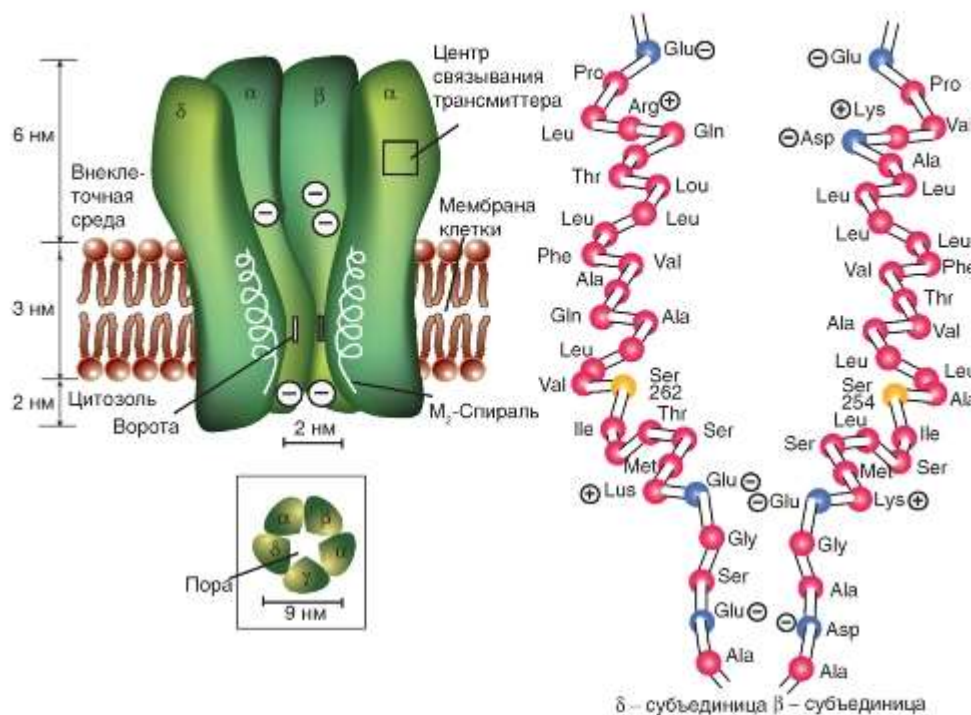
На примере ионотропного никотинового холинергического синапса рассмотрим ацетилхолиновую передачу с участием ионотропного nACh-рецептора. Итак, в этом синапсе в качестве трансммиттера из везикул выбрасывается АЦХ, и такой синапс называется холинергическим никотиновым синапсом. Примером холинергического синапса является нервно-мышечный синапс.

В постсинаптической мембране выделяют так называемую субсинаптическую мембранную зону непосредственного контакта пресинаптической мембраны с мембраной постсинаптической клетки, которую иначе называют активной зоной синапсов, где находятся протеины, связывающиеся с молекулами трансммиттера и поэтому называющиеся рецепторами. Обратите внимание, что существует два понятия, заложенные в термин «рецептор». В одном случае под термином «рецептор» подразумеваются нервные окончания чувствительного нейрона, или специализированные нервные клетки, но в другом случае это белковые структуры, встроенные в мембрану, которые имеют места связи для сигнальных молекул, например гормоны, трансммиттеры и т.д.

Рецепторный белок для nACh-рецептора состоит из 5 субъединиц, вместе образующих пору - ионный канал, пронизывающий клеточную мембрану. Каждый из таких каналов может находиться в двух состояниях - открытом или закрытом. В открытом состоянии каналы имеют строго определенную проницаемость для ионов. Большей частью этот канал закрыт. Но если две молекулы АЦХ связываются с рецептором, то возникает сдвиг заряда внутри макромолекулы и как следствие аллостерическое изменение его формы. Центральный канал расширяется, и его внутренний диаметр становится приблизительно равным 0,65 нм. Благодаря этому центральный канал становится проходимым для катионов натрия и калия. Однако для анионов канал непроеходим из-за имеющихся на внутренних стенках зарядов.

В нормальном состоянии рецепторы для трансммиттеров находятся только в области субсинаптической мембраны. Это относится также и к нервно-мышечному синапсу. Однако, хотя АЦХ-рецепторы находятся преимущественно в субсинаптической мембране, крайне небольшое их количество встречается и на поверхности мышечной клетки. Но если двигательный нерв, например, из-за ранения разорван или сильно поврежден, то АЦХ-рецепторы образуются на всей поверхности мышечной клетки; мышца становится гиперчувствительна к АЦХ.

Рис. 3-12. Структура n-холинорецептора



Глутаматный синапс

Многие соединения используются в синапсах как транзиттеры. Например, глутамат в мозге служит важнейшим транзиттером для возбуждающих синапсов. Синапсы, которые используют в качестве транзиттера глутамат, находятся приблизительно на 50% нейронов ЦНС. Они наиболее распространены в переднем мозге (*telencephalon*) и гиппокампе. Глутаматные синапсы образуют важнейшие возбуждающие входы систем мозга к коре большого мозга. Таким образом, глутамат представляет собой важнейший транзиттер ЦНС. Именно поэтому, например, в качестве средства для наркоза применяют фармакологический препарат кетамин, представляющий собой антагонист глутамата.

Освобождение глутамата происходит в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} в пресинаптической области. Однако завершение синаптического переноса осуществляется не посредством его ферментативного разрушения в синаптической щели, а по механизму обратного захвата транзиттера пресинаптическим нервным окончанием. Кроме того, в этом процессе участвует астроглия.

Глутамат прямо открывает неспецифический ионный канал для катионов. Существует, по крайней мере, три основных типа постсинаптических рецепторов, у

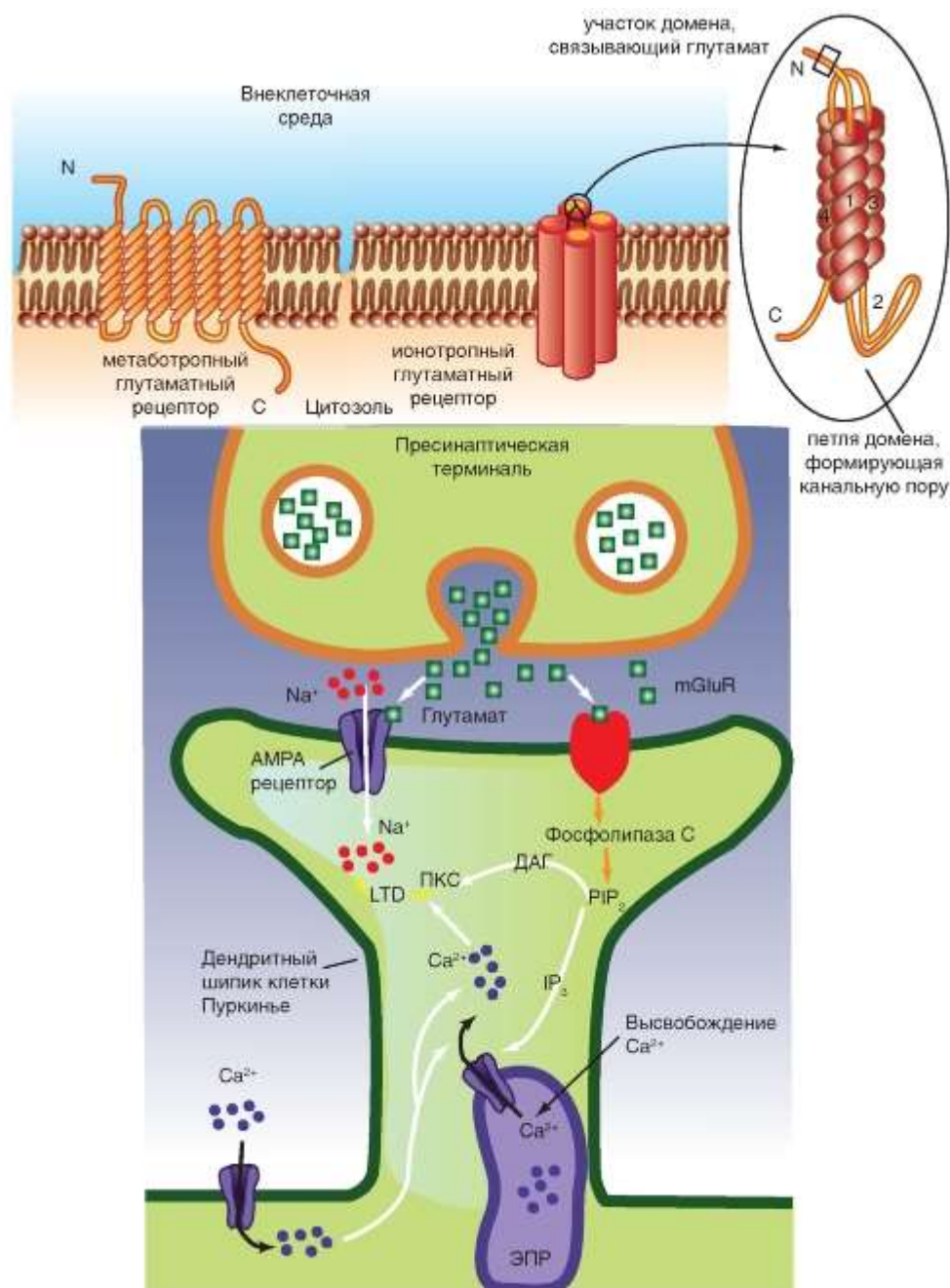
каждого из которых много подтипов. Они различаются по своей способности связываться с экзогенными агонистами. К этим рецепторам относятся ионотропные рецепторы - лиганд-управляемые катионные каналы - NMDA (N-метил-D-аспартат), AMPA (α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовая кислота) и metabotropic $mGluR_{1-5}$, действие которого осуществляется через IP_3/DAG .

На рисунке 3-13 показано, что освобожденный из пресинаптической области глутамат параллельно активирует два рецептора постсинаптической мембраны - ионотропный лиганд-управляемый рецептор, служащий катионным каналом AMPA, и metabotropic рецептор $mGluR_{1-5}$. Рецептор $mGluR_{1-5}$ активирует фосфолипазу C, которая расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на DAG и IP_3 . IP_3 вызывает высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума. Кроме того, Ca^{2+} поступает через потенциал-управляемые каналы мембраны клетки, что приводит не только к увеличению его уровня, но и активации высвобождения из эндоплазматического ретикулума. Повышение уровня Ca^{2+} и появление DAG совместно активируют протеинкиназу C, которая меняет свойства AMPA, приводя к возникновению эффекта долговременной депрессии (*Long-Term depression - LTD*).

Процесс каждого синаптического переноса должен быстро заканчиваться, в противном случае ответ не возникал бы под влиянием вновь поступающих сигналов и наблюдался бы блок деполяризации. Организм обладает многими способами прекращения синаптического тока. В качестве первого можно назвать десенситизацию, т.е. уменьшение чувствительности рецептора к большим концентрациям трансммиттера, например в результате длительной синаптической активности. В этом случае, несмотря на непрерывное связывание трансммиттера с рецептором, конформация каналаобразующего белка меняется так, что канал становится непроницаемым для ионов. При этом синаптический ток прекращается, и процесс переноса заканчивается. Десенситизация наиболее часто осуществляет быстрые механизмы уменьшения чувствительности рецептора. У большинства синапсов десенситизация рецептора может, однако, длиться минуты, до тех пор, пока канал реконфигурируется и станет вновь возбудимым.

Чтобы избежать длительной десенситизации есть другие возможности прекращения действия трансммиттера. Трансммиттер может быть либо быстро химически расщеплен на неактивные компоненты, либо удален из синаптической щели путем высокоселективного обратного захвата в пресинаптическое окончание. В ЦНС клетки глии могут также захватывать трансммиттер. Кроме того, на возбуждающих глутаматергических синапсах синаптическая область плотно покрыта отростками астроцитов. Какой из инактивирующих механизмов играет в синапсе большую роль, зависит от типа синапса.

Рис. 3-13. Один из механизмов работы глутаматного синапса



Фосфорилирование и дефосфорилирование в глутаматном синапсе

Глутаматный синапс содержит на постсинаптической мембране два типа ионотропных рецепторов. К ним относятся лиганд-управляемые катионные каналы - NMDA и AMPA. Первый тип рецептора назван NMDA-рецептором, поскольку с ним связывается NMDA. К другому типу относится AMPA-рецептор, связывающийся с AMPA.

На рисунке 3-14 А показано, что освобожденный из пресинаптической области глутамат параллельно активирует два ионотропных рецептора - лиганд-управляемых канала постсинаптической мембраны, являющихся катионными каналами AMPA и NMDA. Через катионный канал AMPA в постсинаптическую область входят ионы Na^+ , которые деполяризуют постсинаптическую мембрану. В отличие от AMPA, NMDA-канал открывается, если постсинаптическая мембрана достаточно деполяризована. Через этот канал в постсинаптическую область поступают и ионы Na^+ и Ca^{2+} . Вход Ca^{2+} в клетку приводит к активации протеинкиназы С. Параллельно Ca^{2+} связывается в комплекс с

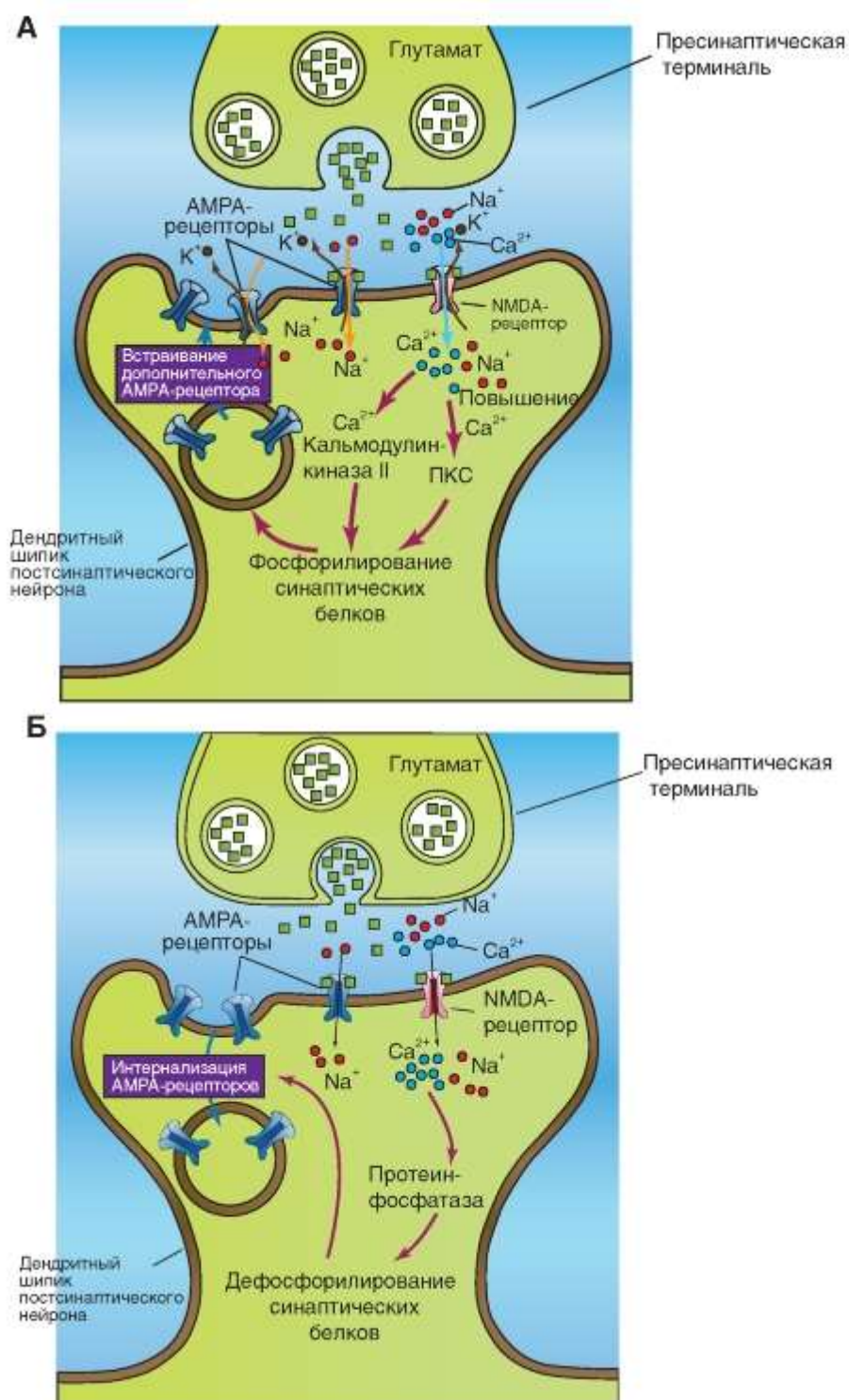
кальмодулином и активирует Ca^{2+} /кальмодулин киназу II. Оба этих процесса направлены на фосфорилирование синаптических белков. В итоге запускается процесс введения дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану, как это показано на рисунке, который способствует длительному потенцированию - долговременному синаптическому потенцированию (*Long-Term potentiation - LTP*).

Но чрезмерное возбуждение многих NMDA синапсов может также необратимо повредить постсинаптические клетки (так называемая эксайтотоксичность - цитотоксичность, свойственная возбуждающим нейротрансмиттерам, например, глутамату и аспартату), что, по-видимому, осуществляется при действии значительного входящего тока ионов Ca^{2+} . Очевидно, десенситизация наступает на рецепторах этого типа очень медленно. Эксайтотоксичность усиливает многие неврологические заболевания, такие, как нарушение слуха, течение болезни Альцгеймера или наследственные повреждения, вызванные первичной гипоксией.

На рисунке 3-14 Б, как и на предыдущем, показано, что глутаматный синапс содержит на постсинаптической мембране два типа ионотропных рецепторов. К ним относятся лигандуправляемые катионные каналы - NMDA и AMPA. Но на этом рисунке продемонстрирован противоположный эффект - не вставка дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану, а наоборот, интернализация AMPA-рецепторов из постсинаптической мембраны. Низкоамплитудный подъем концентрации Ca^{2+} в клетке активирует протеинфосфатазу, находящуюся в постсинаптической зоне. Это ведет к дефосфорилированию синаптических белков и тем самым к интернализации AMPA-рецепторов из постсинаптической мембраны, уменьшая возможность связывания с AMPA-рецепторами освободившегося глутамата. Благодаря этому механизму возможно уменьшение синаптической активности долговременная синаптическая депрессия (*Long-Term depression - LTD*).

На многих описанных синапсах вместо глутамата находится аспартат. Часто на NMDA-рецепторах глицин является котрансммиттером. Кетамин, применяемый для наркоза, представляет собой неконкурентный блокатор NMDA-рецепторов. Из синаптической щели глутамат удаляется либо посредством обратного захвата в пресинаптическую область, либо в клетки глии. Наряду с ионотропными рецепторами к глутамату существует еще ряд метаботропных глутаматных рецепторов.

Рис. 3-14. Глутамат и механизм работы синапса с этим трансмиттером через ионотропные рецепторы (лигандуправляемые катионные каналы) NMDA и AMPA, направленный на фосфорилирование (А) или дефосфорилирование (Б) синаптических белков и вставку дополнительных AMPA-рецепторов в постсинаптическую мембрану



Механизм долговременной потенциации и долговременной синаптической депрессии

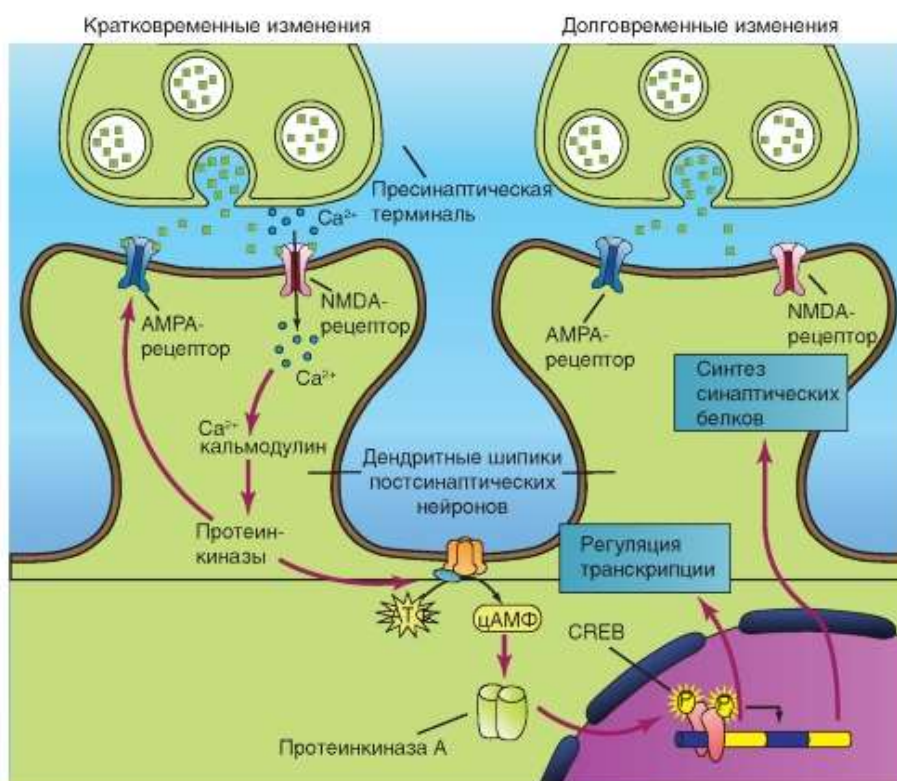
На рисунке 3-15 показаны пути, приводящие к повышению уровня цАМФ и активации цАМФзависимой PKA. Активация ферментативной активности цАМФзависимой протеинкиназы должна вовлекать отделение регуляторных субъединиц от комплекса. Эта активация происходит в присутствии микромолярных концентраций цАМФ. Каждая регуляторная субъединица связывает две его молекулы. Связывание цАМФ индуцирует конформационные изменения в регуляторных субъединицах и снижает афинность их связывания с каталитическими субъединицами. В результате этого регуляторные субъединицы отделяются от каталитических субъединиц, и каталитические

субъединицы становятся активированными. Каталитические единицы PKA попадают в ядро клетки и запускают процесс транскрипции.

На рисунке показано, что освобожденный из пресинаптической области глутамат активирует ионотропный рецептор - лиганд-управляемый канал постсинаптической мембраны, являющийся катионным каналом NMDA. Вход Ca^{2+} в клетку приводит к связыванию Ca^{2+} с кальмодулином, и этот комплекс активирует протеинкиназы. Аденилатциклаза переводит АТФ в цАМФ, что приводит к активации PKA. Активация PKA вследствие связывания четырех молекул цАМФ вызывает конформационные изменения в регуляторных субъединицах и снижает аффинность их связывания с каталитическими субъединицами, а также приводит к отделению регуляторных субъединиц от каталитических. Далее каталитические единицы проникают в ядро.

Долговременная потенция (*Long-Term potentiation - LTP*) осуществляется через протеинкиназу A, активирующую регулятор транскрипции CREB - *cAMP response element binding protein*.

Рис. 3-15. Механизмы, определяющие кратковременные и долговременные изменения в синаптической передаче

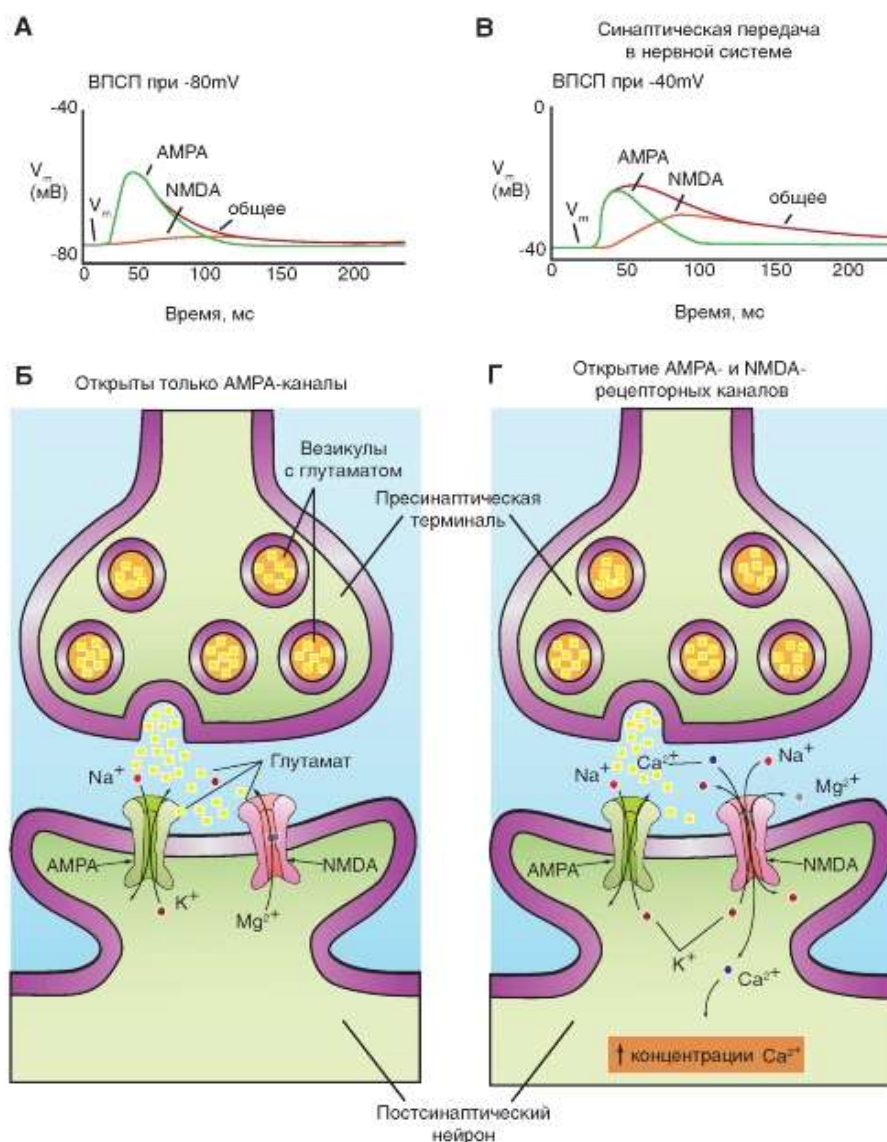


Рецепторы NMDA и AMPA определяют работу глутаматного синапса

Некоторые из глутаматных синапсов, снабженные ионотропными рецепторами - лигандуправляемыми катионными каналами - NMDA и AMPA - обладают, по сравнению с обычными синапсами, дополнительным любопытным механизмом. Ионы Mg^{2+} , которые находятся во внеклеточной жидкости, оказывают на них влияние в качестве неконкурентного блокатора, выключая сопряженный с этим рецептором ионный канал. Таким образом, освобождение трансммитера и связывание его с NMDA-каналом не приводит к эффекту. Если потенциал мембраны постсинаптической клетки благодаря возбуждающим синапсам, имеющим AMPA-канал, совсем немного деполяризуется, то связывание Mg^{2+} уменьшается. После этого Mg^{2+} освобождает ионный канал, и ионы натрия могут проникать в клетку, вызывая, таким образом, сильную деполяризацию.

Рис. 3-16. Потенциалы, возникающие на постсинаптической мембране глутаматного синапса, которые определяются работой ионотропных рецепторов - лигандуправляемых катионных каналов - NMDA и AMPA.

А - потенциалы, генерируемые AMPA в условиях блокады ионами Mg^{2+} NMDA и суммарный потенциал. Ионы Mg^{2+} неконкурентно блокируют ионный канал NMDA. Так что даже после связывания глутамата ионный ток не может течь. Б - если перед этим возбуждающий глутаматный синапс на клетке слегка кратковременно преддеполяризовать (сместить потенциал мембраны в более положительную область), то ионы Mg^{2+} не смогут больше быть связанными с NMDA-каналами. Блок Mg^{2+} снимается, и ионы Na^+ и Ca^{2+} могут устремиться в клетку. Ионы Ca^{2+} могут использоваться в качестве внутриклеточного вторичного мессенджера и регулировать дальнейшие процессы



ГАМК как трансммиттер

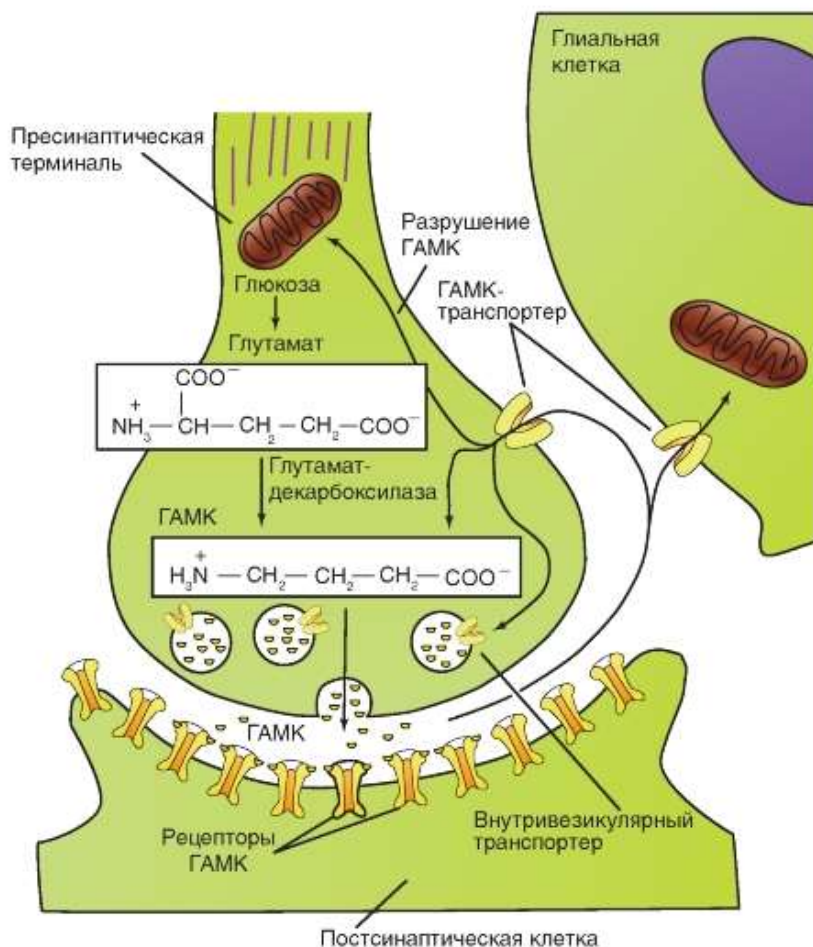
Многие тормозные интернейроны, присутствующие практически во всех отделах ЦНС, и аксоны клеток Пуркинью мозжечка выбрасывают в качестве трансммиттера γ -аминомасляную кислоту (ГАМК, GABA: γ -Aminobutyric acid). ГАМК оказывает тормозное действие на постсинаптические структуры. Существует по меньшей мере два различных постсинаптических механизма, запускающихся благодаря различным рецепторам (ГАМК_A, ГАМК_C с одной стороны; ГАМК_B с другой стороны).

ГАМК_A-и ГАМК_C-рецепторы непосредственно открывают каналы для ионов Cl⁻, что приводит к появлению входящего Cl⁻-тока и тем самым к гиперполяризации в виде ТПСР. Барбитураты (препараты, применяемые для наркоза), стероидные анестетики и транквилизаторы (успокаивающие средства) из класса бензодиазепинов (например, диазепам) усиливают ингибиторное действие ГАМК_A-рецепторов. Механизм их действия заключается в связывании с белком ионного канала, который уже взаимодействует с ГАМК, и таким образом в усилении действия ГАМК.

Канал построен из нескольких субъединиц. Одна из этих субъединиц связывает ГАМК, другая может дополнительно связать бензодиазепин, третья - связать барбитурат и еще одна - связать стероид. В настоящее время неясно, какие природные вещества (например, нейромодуляторы) оказывают действие на так называемые бензодиазепиновые или барбитуратные рецепторы. Названные субъединицы могут обладать различными химическими свойствами, определяемыми их химической структурой, что обуславливает различные фармакологические эффекты. Бикукуллин[®] представляет собой конкурентный блокатор для ГАМК_A-, но не для ГАМК_C-рецептора. Яд пикротоксин, вызывающий судороги, является неконкурентным блокатором, закрывающим канал для ионов Cl⁻.

ГАМК_B открывают каналы для ионов K⁺ посредством G-белка. Агонистом служит баклофен. Пресинаптические ГАМК_B-рецепторы закрывают каналы Ca²⁺ и тормозят освобождение транмиссера. Действие ГАМК прекращается путем обратного захвата ГАМК пресинаптическим окончанием и клетками глии.

Рис. 3-17. γ-Аминomásляная кислота как транмиссер в синапсе: расщепление, удаление и обратный захват

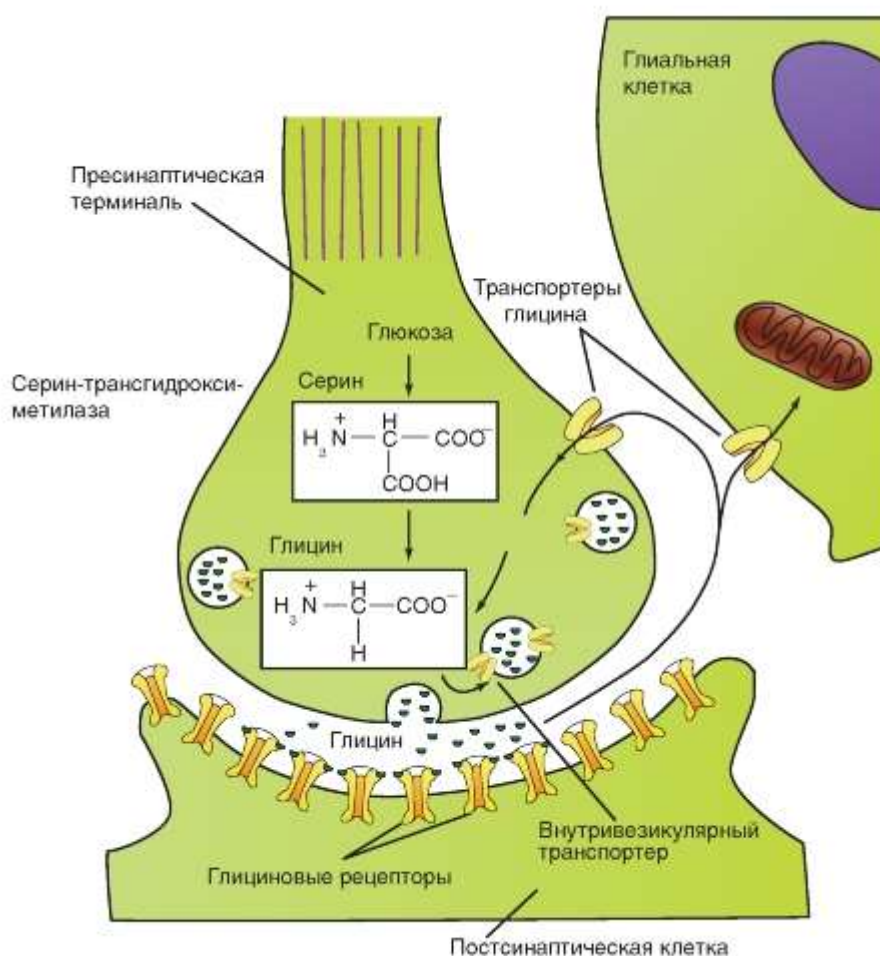


Глицин как трансммиттер

Аминокислота глицин выполняет функцию трансммиттера в тормозных синапсах и действует как нейромодулятор. Глицин выполняет специфические ингибиторные задачи. Большинство клеток Реншоу, через которые осуществляется торможение α -мотонейронов спинного мозга, высвобождают глицин. Стрихнин является конкурентным антагонистом, и его применение приводит к судорогам из-за отсутствия торможения α -мотонейронов. Рецепторы глицина открывают Cl^- -каналы, что способствует возникновению ТПСЦ. Синаптическое действие заканчивается с помощью механизма обратного захвата глицина.

В ЦНС глицин играет также и роль нейромодулятора, например в гиппокампе NMDA-рецепторы, описанные ранее, испытывают модулирующее влияние со стороны глицина. Важно заметить, что хотя синапсы называются по наименованию их главного трансммиттера (например, холинергический).

Рис. 3-18. Глицин: расщепление, удаление и обратный захват трансммиттера



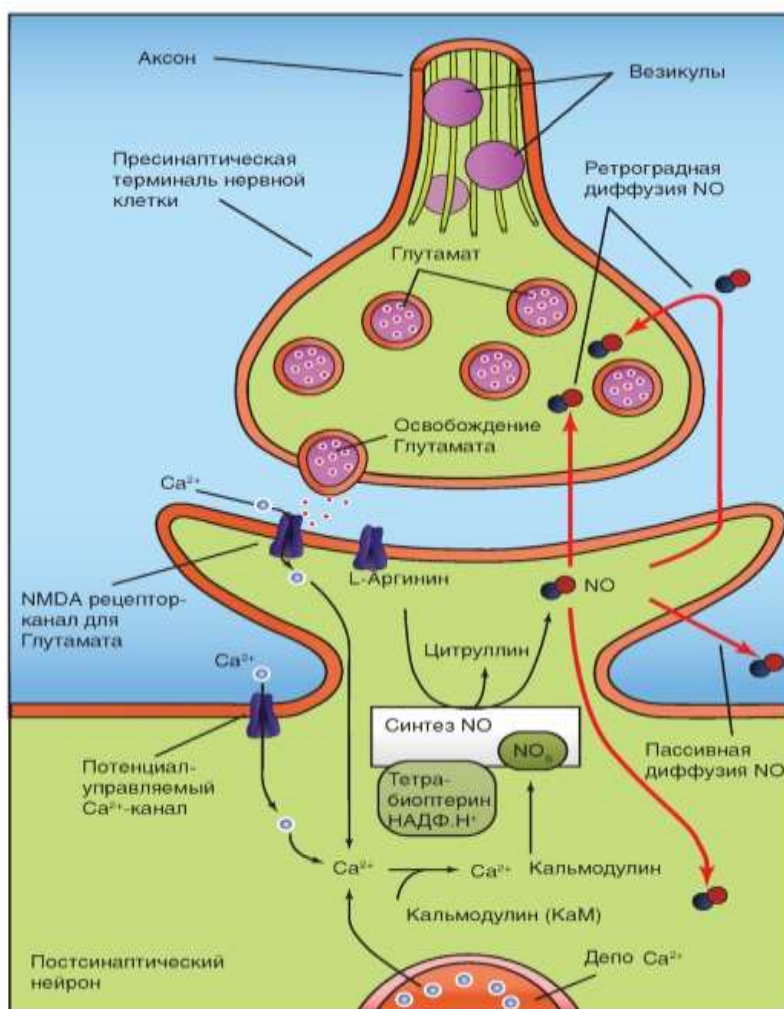
NO как трансммиттер

Оксид азота (NO) - это паракринный медиатор, выделяемый эндотелиальными клетками и некоторыми нейронами. Вследствие того, что NO быстро окисляется, его биологическая жизнь длится всего несколько секунд. По этой причине NO влияет только на клетки, находящиеся вблизи от места своего выделения. NO стимулирует растворимую гуанилатциклазу в клетках-мишенях и тем самым повышает в клетке мишени внутриклеточную концентрацию цГМФ. Это, в свою очередь, стимулирует цГМФ-зависимую протеинкиназу.

Оксид азота легко распространяется путем диффузии и может принимать на себя функции транмиссера. При этом, например, пресинаптические процессы могут регулироваться с помощью обратной связи. Возможно, этот вид переноса информации играет большую роль в ЦНС. Механизмы прекращения действия подобных транмиссеров не позволяют включить их в классическую синаптическую схему.

Образование NO катализируется NO-синтазой NO_s - Ca^{2+} -кальмодулин-зависимым ферментом, ускоряющим превращение аргинина в цитруллин и NO. Повышение цитозольного уровня Ca^{2+} приводит к увеличению образования и выделения NO. NO освобождается нервными окончаниями гранулярных клеток мозжечка и действует на постсинаптические клетки Пуркинью мозжечка. NO выделяется эндотелиальными клетками под влиянием агонистов типа ацетилхолина, присоединение которого к мускариновым рецепторам повышает внутриклеточный уровень Ca^{2+} . Освобождение NO эндотелиальными клетками вызывает вазодилатацию в близлежащих клетках гладких мышц сосудов. Кроме того, NO служит одним из нейротранмиссеров, освобождаемых нейронами и иннервирующих кишечник. Действуя на гладкомышечные клетки желудочно-кишечного тракта, NO подавляет их сократительную активность.

Рис. 3-19. Оксид азота (NO) в качестве транмиссера, освобождаемого нейронами



Возбуждающий постсинаптический потенциал (ВПСП)

Рассмотрим этот вопрос на примере АЦХ. Взаимодействуя с рецептором, молекулы АЦХ открывают неспецифические ионные каналы в постсинаптической мембране клетки так, что повышается их способность к проводимости для одновалентных катионов. Существует сильная движущая сила для натрия, и ионы Na^+ устремляются внутрь клетки и

деполяризуют ее мембрану. С другой стороны, канал проходим и для ионов K^+ , для которых сохраняется незначительный электрохимический градиент, направленный из внутриклеточной области к внеклеточной среде. Через постсинаптическую мембрану одновременно проходят и ионы K^+ , тем самым слегка противодействуя деполяризации, обусловленной входящим током ионов Na^+ . Работа описанных каналов ведет к базовому входящему току положительных ионов и, следовательно, к деполяризации постсинаптической мембраны, которая называется применительно к синапсам ВПСП. На концевой пластинке нервно-мышечного синапса ВПСП называют также потенциалом концевой пластинки. Так как участвующие ионные токи зависят от разности их потенциала равновесия и потенциала мембраны, то при уменьшенном потенциале покоя мембраны ток ионов Na^+ становится всегда меньше, а ток ионов K^+ - больше. Именно поэтому амплитуда ВПСП уменьшается.

В механизме генерации ВПСП участвуют и другие ионные каналы с другими свойствами (лигандуправляемые, а не потенциал-управляемые), и проводимость трансмиссигер-управляемых каналов (лиганд-управляемых) зависит только от количества молекул трансмиссигера, связавшихся с молекулами рецептора. Амплитуда ВПСП лежит в диапазоне от 100 μV до (в некоторых случаях) 10 мВ. В зависимости от вида синапса, общая продолжительность ВПСП лежит в диапазоне от 5 до 100 мс.

Прежде всего, в зоне синапса образовавшийся локально ВПСП распространяется пассивно электротонически по всей постсинаптической мембране клетки. Этот процесс не подчиняется закону «все или ничего». Если большое число возбуждающих синапсов активируются одновременно или почти одновременно, то возникает явление так называемой суммации, которое реализуется в виде возникновения ВПСП существенно большей амплитуды, что может деполяризовать мембрану всей постсинаптической клетки. Если величина этой деполяризации достигает в области постсинаптической мембраны порогового значения (10 мВ или больше), то на аксонном холмике нервной клетки молниеносно открываются потенциал-управляемые Na^+ -каналы, и клетка генерирует потенциал действия, который проводится вдоль аксона. В случае моторной концевой пластинки это приводит к мышечному сокращению. От начала ВПСП до образования потенциала действия проходит еще около 0,3 мс, так что при обильном освобождении трансмиссигера постсинаптический потенциал может появиться уже через 0,5-0,6 мс после пришедшего в пресинаптическую область потенциала действия. В общих чертах, время «синаптической задержки», подразумевающее необходимое время между возникновением пре- и постсинаптического потенциала действия, всегда зависит от типа синапса.

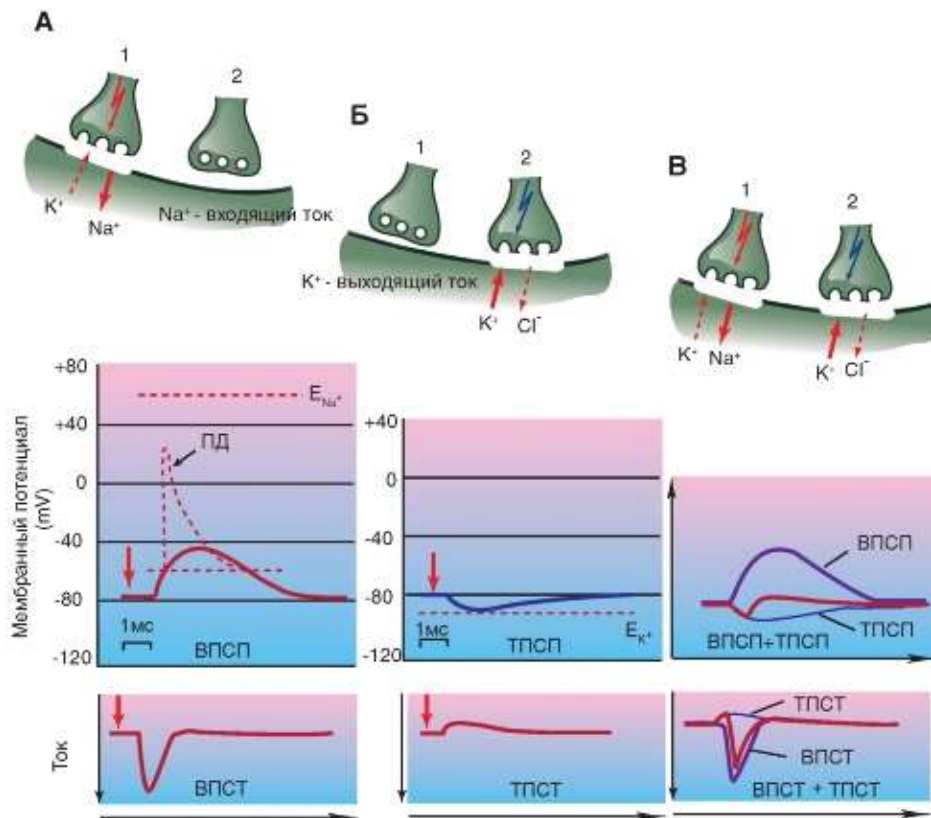
Тормозной постсинаптический потенциал (ТПСП)

Решающими для ионного тока в мембране оказываются величина ее потенциала и количество открытых ионных каналов. Определяющим оказывается тип белка канала, на который действует трансмиссигер. Так на одних синапсах находятся каналы для K^+ , тогда как на других есть каналы для Cl^- . Последние распространены много чаще. Рассмотрим в виде примера рецептор метаботропного синапса, повышающий при связывании с трансмиссигером проводимость для ионов K^+ . При нормальной величине потенциала мембраны это приводит к дальнейшему выходящему току ионов K^+ и гиперполяризации потенциала мембраны. Возникает так называемый ТПСП. Принципиально похожая ситуация складывается, если гиперполяризующий мембрану ток связан с ионами Cl^- . Cl^- течет в клетку и гиперполяризует ее. Подобная картина характерна для очень многих клеток.

Рис. 3-20. Потенциалы и токи, возникающие на постсинаптической мембране.

А - процессы освобождения трансмиссигера и формирование возбуждающего постсинаптического потенциала (ВПСП) после электрического возбуждения (стрелка),

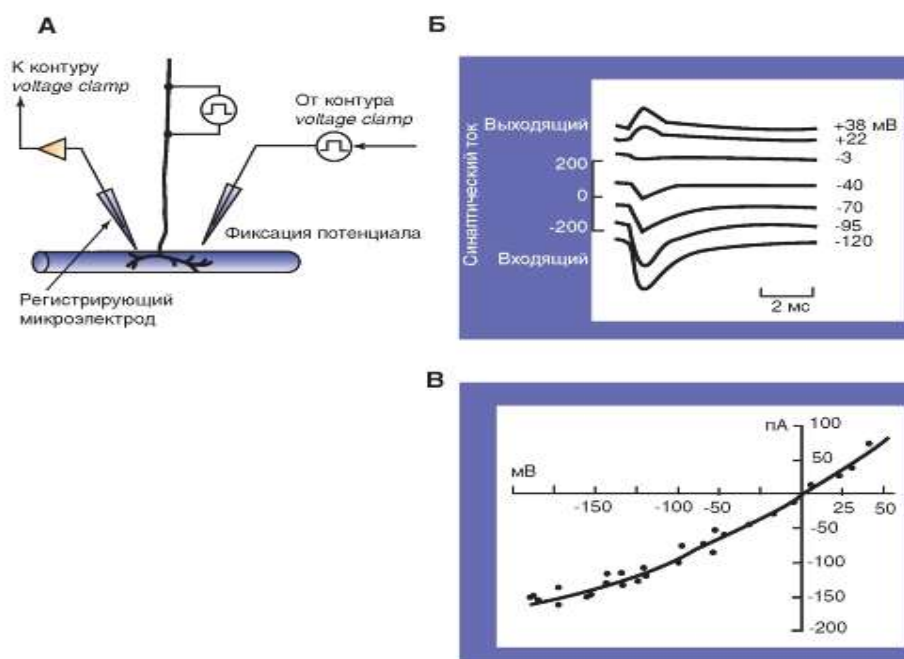
поступившего на пресинаптическое окончание, связаны с возникновением возбуждающего постсинаптического тока (ВПСТ) и генерацией вследствие этого ВПСП. Если ВПСП переходит порог, то возникает потенциал действия (ПД), который во время фазы нарастания благодаря потенциалуправляемым Na^+ каналам деполяризует мембрану в направлении E_{Na} , т.е. к потенциалу равновесия для Na^+ . Б - процессы освобождения транмиттера и формирование ТПСП связаны с ингибиторным постсинаптическим током (ТПСТ) и соответствующим ему ТПСП. При этом ток вызывает движение через мембрану ионов K^+ . Ионы Cl^- могут играть роль, если потенциал мембраны позитивнее, чем потенциал равновесия для Cl^- , который лежит от -75 до -70 мВ. В - токи мембраны при активации возбуждающих (ВПСТ) и ингибиторных синапсов (ТПСТ) и возникающие в этом случае результирующие постсинаптические потенциалы (ВПСП, ТПСП). При одновременной активации возбуждающих и тормозных синапсов возникающие мембранные токи суммируются, поэтому результирующий постсинаптический потенциал (красный) становится очень маленьким в условиях фиксации потенциала.



Синаптические ионные токи

На панели (А) представлена схема регистрации токов концевой пластинки нервно-мышечного препарата в условиях фиксации потенциала. На панели (Б) представлены синаптические токи, зарегистрированные при смещении мембранного потенциала тестовыми ступеньками в диапазоне от -120 до +38 мВ при поддерживаемом потенциале. При отрицательных значениях мембранного потенциала синаптические токи имеют входящее направление. Если мембранный потенциал не фиксировать, то входящий ток приведет к деполяризации мышечного волокна. При положительных значениях мембранного потенциала синаптические токи направлены из клетки наружу. На панели (В) представлена зависимость амплитуды синаптического тока от мембранного потенциала. Эта зависимость близка к линейной, и потенциал реверсии синаптических токов находится около нуля.

Рис. 3-21. Синаптические ионные токи и потенциал реверсии, измененный в условиях фиксации потенциала



Взаимное влияние ВПСП и ТПСР

Если на мембране клетки активируются одновременно возбуждающие и тормозные синапсы, то ионный ток уменьшается. В этом случае организм обладает возможностью эффективно подавлять возбуждающие или тормозящие влияния на нервной клетке.

Нервная клетка усыпана тысячами синаптических окончаний, часть из которых возбуждающие, а часть - тормозные. Если соседствующие возбуждающие и тормозные синапсы (одновременно) активируются, то возникающие токи накладываются друг на друга. Результирующий постсинаптический потенциал (по абсолютной величине) меньше, чем только один ВПСП или только один ТПСР. При одновременной активации возбуждающего и тормозного синапсов результирующий ВПСП может вызывать незначительную деполяризацию мембраны клетки. Тогда клетка возбуждается менее сильно, т.е. тормозится. При этом является существенным не ТПСР, а гиперполяризация мембраны вследствие повышения ее проводимости для ионов K^+ или Cl^- . Тем самым потенциал мембраны поддерживается вблизи потенциала равновесия для ионов калия (или хлора) на уровне достаточно больших отрицательных значений, и деполяризующий эффект входящего тока натрия уменьшается. Входящий ток натрия компенсируется выходящим током калия или входящим током хлора.

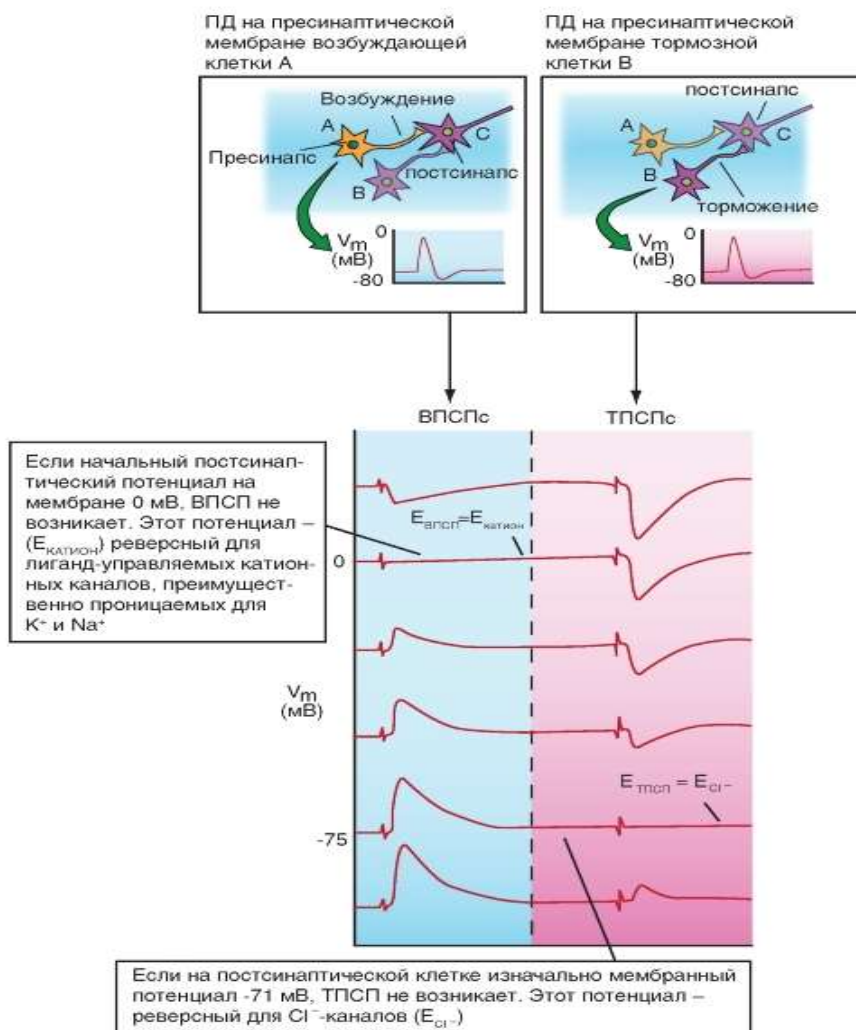
Таким образом, ВПСП возникает благодаря повышению проводимости для натрия и тем самым благодаря входящему току натрия, а ТПСР - благодаря выходящему току калия или входящему току хлора.

Исходя из этого можно было бы предположить, что понижение проводимости для калия должно деполяризовать мембрану клетки, между тем как уменьшение проводимости для натрия должно было бы привести к гиперполяризации. Это действительно так. Природа также использует этот механизм, а именно - закрытие ионных каналов в результате связывания трансммиттера с рецептором. Синапсы, у которых деполяризация вызывается уменьшением проводимости калия, находятся в ганглиях автономной нервной системы. Там, главным образом, присутствуют синапсы, у которых АЦХ, активируя входящий ток натрия, вызывает ВПСП. Но есть также и те синапсы, у

которых АЦХ уменьшает существующую проводимость калия и тем самым вызывает (длительные) ВПСП. Уменьшение существующей проводимости натрия, приводящее к гиперполяризации мембраны клетки, можно наблюдать в палочках и колбочках сетчатки.

Еще необходимо отметить, что механизм возникновения постсинаптических потенциалов соответствует механизму образования так называемых рецепторных потенциалов в клетках органов чувств (рецепторных клетках), где ионные каналы открываются или закрываются с помощью определенного химического или физического раздражения. Сходство не удивляет. Синапс - это высоко специализированная структура, которая реагирует высокоспецифично на определенные химические вещества.

Рис. 3-22. ВПСП и ТПСП на мембране клетки взаимно влияют друг на друга



Лиганд-управляемые ионные каналы. Их токи

На примере двух различных типов лигандуправляемых ионных каналов (одиночного ионного канала, связанного с АЦХ-рецептором, и одиночного K^+ -канала, активируемого АЦХ) мы продемонстрируем условия, приводящие к их открытию, и токи, текущие через них.

Для описания первого типа лиганд-управляемых ионных каналов в качестве примера приведем никотиновый ацетилхолиновый рецептор, который сам служит ионным каналом.

На рисунке 3-23 А1 показана регистрация тока в конфигурации *outside-out*, протекающего через одиночный ионный канал бычьего нАЦХ-рецептора, экспрессированного в ооцит ксенопуса. Этот лиганд-управляемый канал состоит из

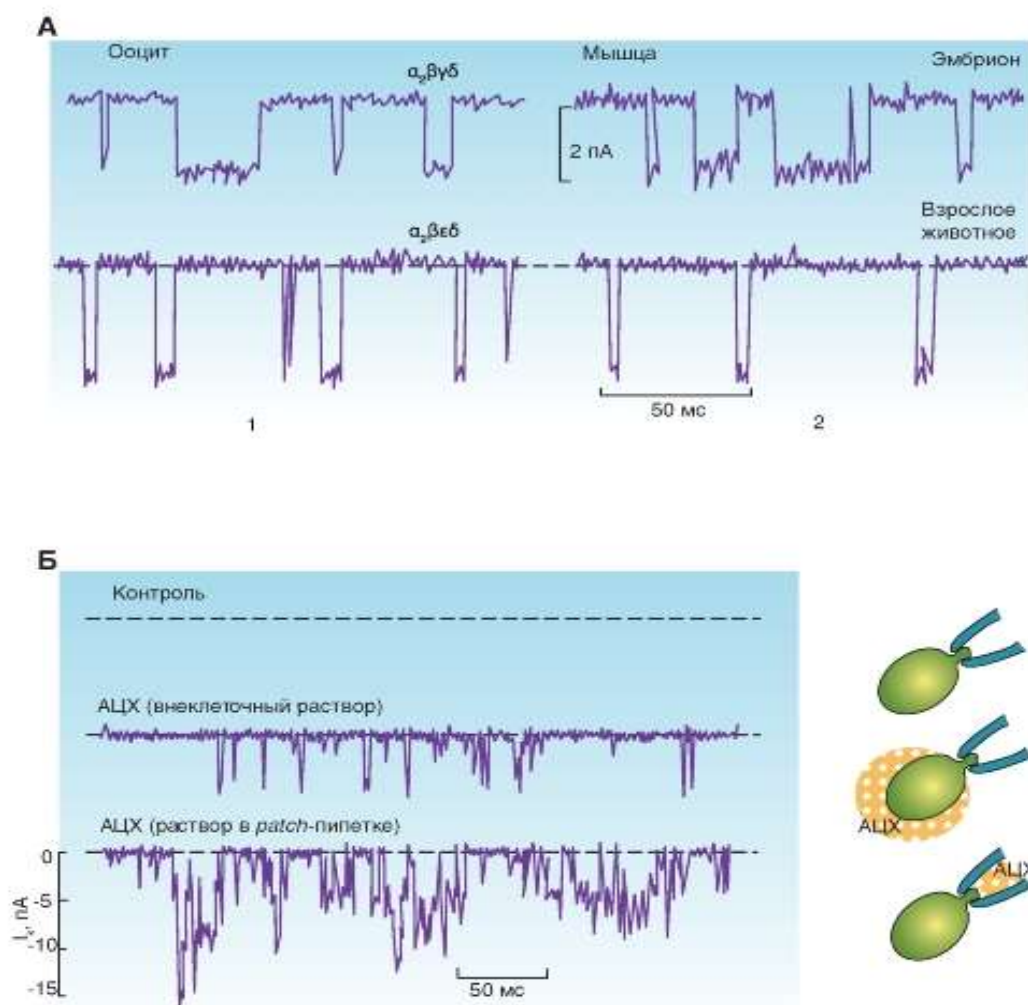
нескольких субъединиц. В первом случае (вверху) канал имеет конфигурацию $\alpha_2\beta\gamma\delta$, во втором случае (снизу) - конфигурацию $\alpha_2\beta\epsilon\delta$. В обоих случаях одиночный ток возникает при стимуляции канала АЦХ в концентрации 500 нМ. На рисунке 3-23 А2 показана реакция нАЦХ-рецептора эмбриональной и взрослой мышц на АЦХ. В обоих случаях реакции возникают только на аппликацию АЦХ.

В качестве второго типа лиганд-управляемого ионного канала рассмотрим K^+ -ионный канал, активируемый АЦХ. На рисунке 3-23 Б показана регистрация входящего K^+ -тока, активируемого АЦХ ($K(ACh)$ -канал). Контрольная регистрация демонстрирует определенную активность канала. На фоне введенного в перфузионный раствор АЦХ в концентрации 100 нМ вероятность открытия канала не меняется, поскольку он находится под *patch*-пипеткой, и АЦХ не может проникнуть в эту область. Нижняя кривая демонстрирует регистрацию на фоне введенного в *patch*-пипетку АЦХ в концентрации 10 нМ. В этом случае наблюдается выраженная активация канала, поскольку соединение контактирует с его рецептором.

Рис. 3-23. Примеры токов АЦХ-управляемые ионные каналы.

А - ток через одиночный ионный канал бычьего n -холинорецептора, экспрессированного в ооцит ксенопуса (1) и мембрану эмбриональных и зрелых мышечных клеток (2).

Б - входящий K^+ -ток через K^+ -канал, активируемый АЦХ (регистрация в конфигурации *cell-attached*)

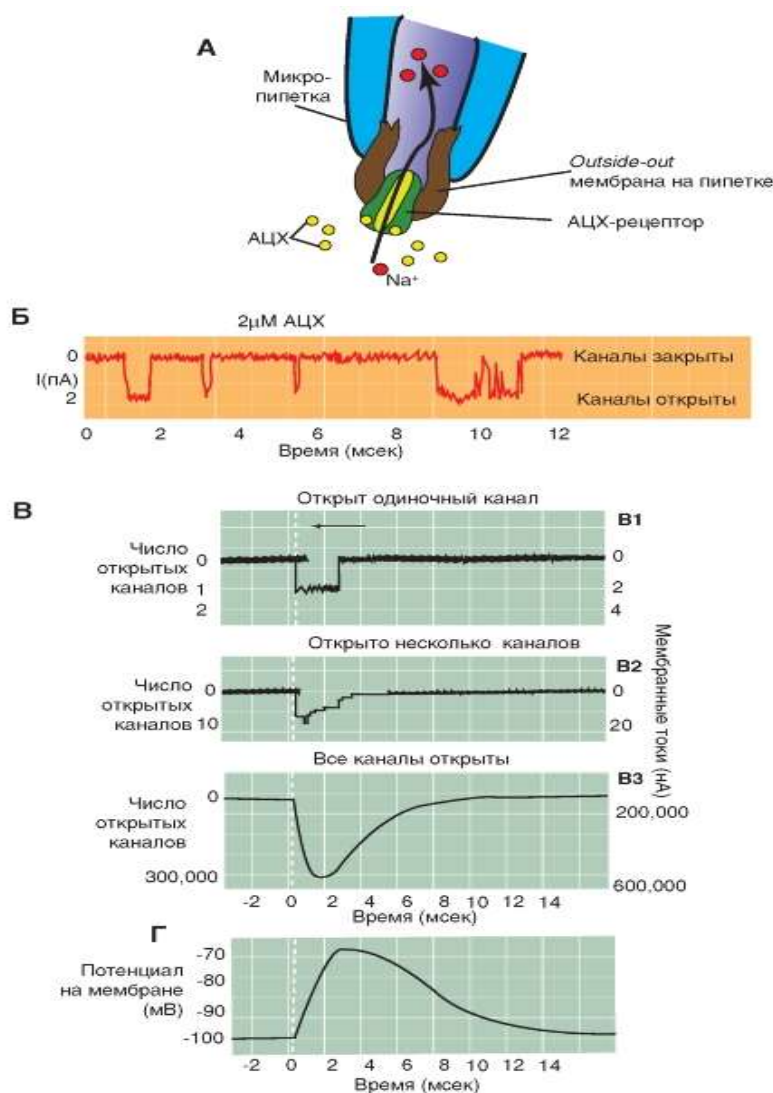


Patch-clamp для изучения канальных токов синапса

При применении метода *patch-clamp* в конфигурации *outside-out*, продемонстрированной на рис. 3-24 А, можно провести измерение тока, текущего через ионотропный одиночный ионный канал, расположенный во фрагменте мембраны под пипеткой, «вырезанной» из постсинаптической мембраны мышечной клетки. Когда АЦХ апплицирован на внешнюю поверхность мембраны, потенциал которой фиксирован на негативном уровне, можно увидеть повторяющиеся короткие открытия одиночного канала (рис. 3-24 Б), которые проявляются в виде резких падений тока в отрицательную область, соответствующих входящему ионному току (т.е. катионы входят в клетку). На рисунке 3-24 В представлено синхронное открытие многих ионотропных одиночных ионных каналов, активированных с помощью АЦХ, у синапса, потенциал которого фиксирован на негативном уровне.

Рисунок 3-24 В1 представляет собой запись эксперимента, в котором на фоне релиза АЦХ из пресинаптической терминали регистрировали одиночный канал. В этом случае канал открывается временно. На рисунке 3-24 В2 представлена запись эксперимента, в котором некоторое число каналов регистрировали одновременно. На фоне релиза АЦХ из пресинаптической терминали наблюдали открытие каналов почти синхронно. На рисунке 3-24 В3 представлена запись эксперимента, в котором регистрировали одновременно большое число каналов, находящихся на постсинаптической мембране. Эти каналы продуцировали так называемый макроскопический ток. На рисунке 3-24 Г показан типичный ВПСП, регистрируемый в режиме фиксации тока, а не фиксации потенциала. ВПСП - это деполяризация мембраны, которая может приводить к генерации потенциала действия.

Рис. 3-24. Активация ацетилхолинового рецептора - ионотропного одиночного ионного канала в нервномышечном синапсе



Соединения с синаптическим влиянием

Наряду с трансмиссером, другие соединения тоже могут влиять на рецепторный белок. Если их связывание с рецептором приводит к одинаковому с трансмиссером эффекту, то их называют агонистами, если же они путем связывания, напротив, препятствуют действию трансмиссера, их называют антагонистами.

Мы видели, что специфическая молекула трансмиссера связывается с белком, образующим канал, открывая его для ионов. Для этого на белке есть связывающий участок. Данный участок не является абсолютно специфическим. Для большинства синапсов установлен целый ряд эндогенных и экзогенных соединений, способных к взаимодействию со связывающим участком, многие из них представляют собой лекарства. Возьмем опять пример никотинового синапса. Его естественным трансмиссером служит АЦХ. Однако с рецептором, предназначенным для АЦХ, могут связываться сходные по структуре химические соединения, например - сукцинилхолин, который имитирует действие АЦХ, что приводит к возникновению ВПСР. Некоторые значительно отличающиеся по химическому строению молекулы, например никотин, также могут соединяться со связывающим участком рецепторного белка. Вещества, действующие подобно трансмиссеру, называются агонистами. Часто такие соединения используют для идентификации рецептора. Так, например, произошло с никотином, что породило название «никотиновый синапс».

Наряду с агонистами, существуют химические соединения, которые хотя и связываются с молекулой рецептора, но не могут открывать ионный канал. Занимая связывающий участок, они препятствуют рецепции естественного трансмиттера и возникновению его эффекта. В результате эти соединения блокируют ионный канал, препятствуя его открытию. Такие вещества называют антагонистами. Например, содержащийся в яде кураре, которым индейцы смазывали наконечники стрел, d-тубокурарин, представляет собой конкурентный блокатор для никотиновых рецепторов. Он конкурирует с природным трансмиттером, связываясь с АЦХ-рецептором нервно-мышечного синапса, и препятствует произвольным сокращениям мышц, что приводит к смерти через остановку дыхания. Курареподобные вещества применяют в настоящее время на фоне анестезии при хирургических операциях для мышечной релаксации. Другим соединением, которое высоко специфично и конкурентно связывается с никотиновыми АЦХ-рецепторами, является змеиный яд α -бунгаротоксин. Он действует уже в наномолярной концентрации и может применяться в экспериментах для того, чтобы маркировать АЦХ-рецепторы на поверхности клетки.

Препараты типа кураре действуют на мускариновые синапсы, для которых классическим конкурентным блокатором служит атропин. Выше уже были представлены данные о возможности фармакологического влияния на холинергические синапсы. Таблица дает нам информацию о наличии некоторых типов синапсов. Обратите внимание на то, что наблюдаются существенные различия между никотиновыми и мускариновыми рецепторами, и что даже внутри одного типа рецептора есть подтипы, которые нередко существенно отличаются по своим свойствам. Кроме того, большая часть фармакологических препаратов не действует на синапсы ЦНС только потому, что они не могут проникнуть через гематоэнцефалический барьер и достигнуть возможных мест действия.

Блок деполяризации при действии сукцинилхолина и подобных веществ осуществляется благодаря незначительной стойкой деполяризации, возникающей под действием этих соединений. Она ведет к инактивации потенциал-управляемых Na^+ -каналов вблизи концевых пластинок, что препятствует возникновению потенциалов действия мышечного волокна. Наступает и десенситизация АЦХ-рецепторов.

Рис. 3-25. Свойства основных нейротрансмиттеров (см. таблицу)

	Глутамат	Глицин	ГАМК	5-HT=Серотонин	Дофамин	Норадреналин Адреналин	Опиевые пептиды
Рецепторы	NMDA AMPA Каналы MGluR ₁₋₇	GlyR	ГАМК _A ГАМК _B ГАМК _C	5-HT ₁₋₇	D ₁ -D ₅	$\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$	μ, δ, κ
Синтез трансмиттера	—	—	Ацетилиция тирозина GAD	—	α -Метил-ДОФА → фалашиный трансмиттер	α -Метилметилэпонин	—
Накопление трансмиттера	—	—	—	—	Резерпин	—	—
Освобождение трансмиттера	—	—	—	—	Освобождение накопленного с помощью торможения обратного захвата	—	—
Усиление Ослабление	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺	Mg ²⁺ , ДСД	Амфетамин Mg ²⁺	Mg ²⁺	—
Агонисты	NMDA AMPA Каналы AP4(mGluR)	Тяурин	ГАМК _A Мисклол Непрямо: Бензодиазепины, Барбитураты ГАМК _B Ваклофен ГАМК _C SACA	ДСД, α -Methyl-5-HT	Бромкристин	α_1 : Фенилэфрин, Дофамин и Морфин α_2 : Клофелин β_1 : Добутамин β_2 : Салбутамол	Изопротеренол
Антагонисты	—	—	—	—	—	—	
Конкурентные	AP5 CNQX	Стрихнин	Биксукулин (ГАМК _A) Факлофен (ГАМК _B)	Пирролетидин Метиперил ДСД	Галиперидол	α_1 : Проклофин Фенотеролин α_2 : Йохимбин β_1 : Алендрон Пропранолол β_2 : Бутроамин	Налоксон
Не конкурентные	Mg ²⁺ Конкурентно-аналогично Кетамин (NMDA)	Пикрострофин	Пикрострофин (ГАМК _A ГАМК _C)	—	—	—	—
Инактивация трансмиттера	—	—	Обратный захват тормозится с помощью α -метил ГАМК Аминокислоты кальций-тормозит ГАМК- трансмиссию	Обратный захват тормозится при помощи нинамидов, амитриптилина, флуоксетина (антидепрессанты) Торможение моноаминооксидазы снижает разрушение	Каналы, моноамины тормозят обратный захват. Катехол-О-метилтрансфераза снижает разрушение	Торможение ацетилхолина усиливает действие	

Название	Структура	Происхождение или группа
Ацетилхолин	$\text{CH}_3-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	
Глицин	$\text{H}_2\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$	Аминокислота
Глутамат	$\text{H}_3\text{N}^+-\text{CH}(\text{C}(=\text{O})\text{O}^-)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$	Аминокислота
Дофамин	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2^+$	Производное тирозина
Норадреналин	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{NH}_2^+$	Производное тирозина
Адреналин	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$	Производное тирозина
Серотонин (5-гидрокситриптамин)	$\text{HO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{Indole}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2^+$	Производное триптофана
Гистамин	$\text{HC}=\text{C}(\text{NH})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Производное гистидина
γ-аминомасляная кислота (ГАМК)	$\text{H}_2\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}^-$	Производное глутамата
АТФ	$\text{NH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2-\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{O}^-)_2-\text{O}-\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2-\text{NH}_2$	Нуклеотид
Аденозин	$\text{NH}_2-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_2-\text{CH}_2-\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2-\text{NH}_2$	Нуклеозид

Глава 4. Физиология мышц

Общие представления о строении различных мышц

Многие клетки обладают ограниченной способностью преобразовывать химическую энергию в механическую силу и движение, но только в мышечных волокнах этот процесс занял главное место. Основная функция этих специализированных клеток состоит в генерировании силы и движений, которые организм использует, чтобы регулировать внутреннюю среду и перемещаться во внешнем пространстве.

На основании структуры, сократительных свойств и механизмов регуляции различают три вида мышечной ткани:

- 1) скелетные мышцы;

- 2) гладкая мускулатура;
- 3) сердечная мышца (миокард).

Скелетные мышцы, как следует из их названия, прикреплены, как правило, к костям скелета; благодаря сокращениям этих мышц поддерживается положение скелета в пространстве и происходят его движения. Сокращения возникают под влиянием импульсов от нервных клеток и обычно бывают произвольными.

На рисунке 4-1 А представлены волокна скелетной мышцы (верхняя панель), клетка сердечной мышцы (средняя панель) и клетка гладкой мышцы (нижняя панель). Клетка скелетной мышцы называется мышечным волокном. В процессе эмбрионального развития каждое мышечное волокно формируется путем слияния многих недифференцированных одноядерных клеток (миобластов) в одну цилиндрическую многоядерную клетку. Дифференцировка скелетных мышц завершается примерно к моменту рождения. В период от младенческого до взрослого состояния организма размеры дифференцированных мышечных волокон продолжают увеличиваться, но новые волокна из миобластов не образуются. У взрослого человека диаметр мышечных волокон достигает 10-100 мкм, длина - до 20 см.

Если в постнатальный период происходит повреждение скелетных мышечных волокон, они не могут замещаться путем деления сохранившихся волокон, однако новые волокна образуются из недифференцированных клеток, так называемых клеточесателлитов, расположенных рядом с мышечными волокнами и подвергающихся дифференцировке аналогично эмбриональным миобластам. Возможности формирования новых волокон в скелетной мышце значительны, однако после сильного повреждения она целиком уже не восстанавливается. Важную роль в компенсации утраченной мышечной ткани играет увеличение неповрежденных мышечных волокон.

На рисунке рис. 4-1 А, Г представлена также сердечная мышца (миокард), которая обеспечивает работу сердца.

Слои гладких мышц находятся в стенках полых внутренних органов и трубчатых образований: желудка, кишечника, мочевого пузыря, матки, кровеносных сосудов, бронхов. В результате сокращений гладких мышц проталкивается содержимое полых органов, регулируется ток жидкости в сосудах и протоках путем изменений их диаметра. Маленькие пучки гладкомышечных клеток находятся также в коже около волосяных сумок и в радужной оболочке глаза. Сокращениями гладких мышц управляет вегетативная нервная система, гормоны, аутокринные / паракринные факторы, другие местные химические сигналы. Некоторые гладкие мышцы спонтанно сокращаются даже при отсутствии сигналов. В отличие от скелетных мышц, гладкая мускулатура не имеет произвольной регуляции.

Несмотря на существенные различия между этими тремя видами мышц, у них сходный механизм генерирования силы. Сначала будут рассмотрены скелетные мышцы, затем гладкая мускулатура. Сердечная мышца характеризуется сочетанием ряда свойств двух первых видов мышц.

Наиболее примечательная характеристика волокон скелетной, а также сердечной мышц при изучении с помощью светового микроскопа - чередование светлых и темных полос, поперечных по отношению к длинной оси волокна. Благодаря этой особенности оба типа мышц относят к поперечнополосатым мышцам (рис. 4-1 А, верхняя и средняя панели). В гладкой мышце такая картина отсутствует (рис. 4-1 А, нижняя панель).

В скелетной мышце толстые и тонкие филаменты образуют периодический рисунок вдоль каждой миофибриллы. Регулярно повторяющийся элемент этого рисунка известен

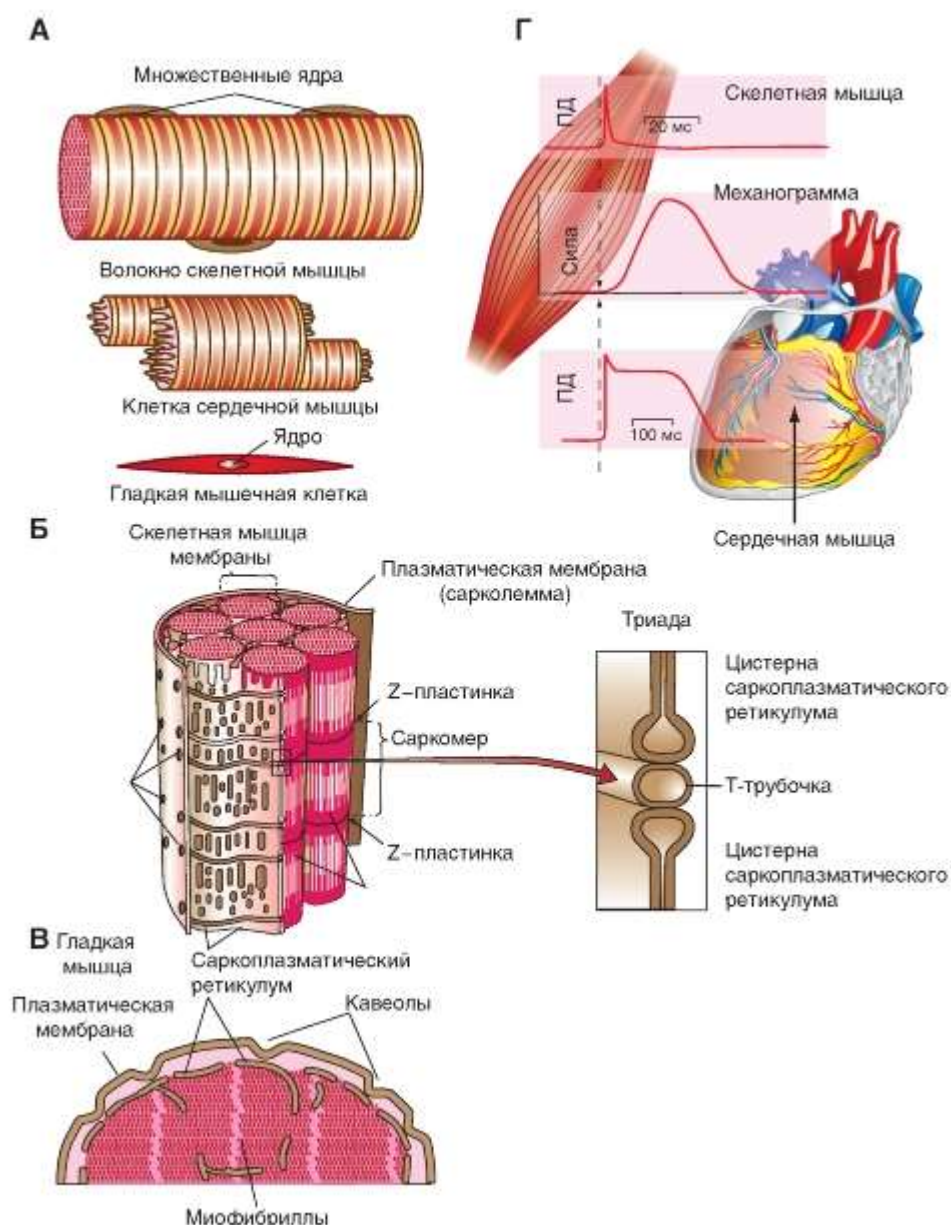
как саркомер (от греч. sarco - мышца, mere - маленький) (увеличенный фрагмент на рис. 4-1 Б). Каждый саркомер включает в себя триаду:

- 1) цистерну саркоплазматического ретикулума;
- 2) поперечную тубулу;
- 3) еще одну цистерну саркоплазматического ретикулума (рис. 4-1 Б).

На рисунке 4-1 В представлено строение гладкой мышцы, которое отличается от скелетной.

Совмещенный рисунок 4-1 Г демонстрирует синхронную запись потенциалов действия, а также механограмму скелетной мышцы и мышцы сердца.

Рис. 4-1. Организация волокон и филаментов в скелетной и гладкой мышцах



Типы мышц

Существуют три типа мышц: скелетные, гладкие и миокард. Скелетные мышцы прикреплены к костям, осуществляя их поддержку и движение. Гладкая мускулатура

окружает полые и трубчатые органы. Сердечная мышца (миокард) обеспечивает работу сердца.

Скелетные мышцы

1. Скелетные мышцы состоят из цилиндрических мышечных волокон (клеток); каждый конец мышцы соединен посредством сухожилий с костями.

2. Волокна скелетных мышц характеризуются периодическим чередованием светлых и темных полос, отражающих пространственную организацию толстых и тонких филаментов в миофибриллах.

3. Тонкие филаменты, содержащие актин, прикреплены на обоих краях саркомера к Z-поло-сам; свободные концы тонких филаментов частично перекрываются с миозинсодержащими толстыми филаментами в А-полосе центральной части саркомера.

4. Во время активного укорочения скелетного мышечного волокна тонкие филаменты подтягиваются по направлению к центру саркомера в результате движений миозиновых поперечных мостиков, которые связываются с актином:

- две глобулярные головки каждого поперечного мостика содержат участок связывания с актином, а также фермент, расщепляющий АТФ;

- каждый рабочий цикл поперечного мостика состоит из четырех стадий. Во время сокращения поперечные мостики совершают повторные циклы, каждый из которых обеспечивает очень маленькое продвижение тонких филаментов;

- АТФ выполняет во время мышечного сокращения три функции.

5. В покое мышце прикрепление поперечных мостиков к актину заблокировано молекулами тропомиозина, контактирующими с субъединицами актина тонких филаментов.

6. Сокращение инициируется в результате повышения цитоплазматической концентрации Ca^{2+} . При связывании ионов Ca^{2+} с тропонином изменяется его конформация, благодаря чему тропомиозин смещается, открывая доступ к участкам связывания на молекулах актина; поперечные мостики связываются с тонкими филаментами:

- повышение цитоплазматической концентрации Ca^{2+} запускается потенциалом действия

плазматической мембраны. Потенциал действия распространяется вглубь волокна вдоль поперечных трубочек к саркоплазматическому ретикулуму и вызывает высвобождение Ca^{2+} из ретикулума;

- расслабление мышечного волокна после сокращения происходит в результате активного обратного транспорта Ca^{2+} из цитоплазмы в саркоплазматический ретикулум.

7. Окончания двигательного аксона образуют нервно-мышечные соединения с мышечными волокнами двигательной единицы соответствующего мотонейрона. Каждое мышечное волокно иннервируется ветвью только одного мотонейрона:

- АЦХ, высвобождаемый из двигательных нервных окончаний при поступлении потенциала действия мотонейрона, связывается с рецепторами двигательной концевой пластинки мышечной мембраны; открываются ионные каналы, пропускающие Na^+ и K^+ , благодаря чему концевая пластинка деполяризуется;

- одного потенциала действия мотонейрона достаточно, чтобы вызвать потенциал действия в волокне скелетной мышцы.

8. Существует определенная последовательность процессов, ведущих к сокращению скелетного мышечного волокна.

9. Понятие «сокращение» относится к включению рабочего цикла поперечных мостиков. Изменяется ли при этом длина мышцы, зависит от действия на нее внешних сил.

10. При активации мышечного волокна возможны три типа сокращения:

- изометрическое сокращение, когда мышца генерирует напряжение, но ее длина не меняется;
- изотоническое сокращение, когда мышца укорачивается, перемещая нагрузку;
- удлиняющее сокращение, когда внешняя нагрузка заставляет мышцу удлиняться во время сократительной активности.

11. Повышение частоты потенциалов действия мышечного волокна сопровождается увеличением механической реакции (напряжения или укорочения) до тех пор, пока не будет достигнут максимальный уровень тетанического напряжения.

12. Максимальное изометрическое тетаническое напряжение развивается в случае оптимальной длины саркомера L_0 . При растяжении волокна более его оптимальной длины или уменьшении длины волокна менее L_0 генерируемое им напряжение падает.

13. Скорость укорочения мышечного волокна снижается при повышении нагрузки. Максимальная скорость соответствует нулевой нагрузке.

14. АТФ образуется в мышечных волокнах следующими способами: перенос фосфата с креатинфосфата к АДФ; окислительное фосфорилирование АДФ в митохондриях; субстратное фосфорилирование АДФ в процессе гликолиза.

15. В начале физического упражнения главным источником энергии служит мышечный гликоген. При более длительном упражнении энергия образуется в основном за счет глюкозы и жирных кислот, поступающих с кровью; по мере дальнейшего продолжения физической деятельности возрастает роль жирных кислот. Когда интенсивность физической работы превысит ~70% от максимума, все более значительную часть образующейся АТФ начинает обеспечивать гликолиз.

16. Мышечное утомление обусловлено рядом факторов, включая изменения кислотности внутриклеточной среды, уменьшение запасов гликогена, нарушение электромеханического сопряжения, но не истощение АТФ.

17. Различают три типа скелетных мышечных волокон в зависимости от максимальной скорости укорочения и преобладающего способа образования АТФ: медленные оксидативные, быстрые оксидативные и быстрые гликолитические:

- разная максимальная скорость укорочения быстрых и медленных волокон обусловлена различиями АТФазы миозина: высокой и низкой АТФазной активности соответствуют быстрые и медленные волокна;
- быстрые гликолитические волокна имеют в среднем больший диаметр, чем оксидативные, и потому развивают более значительное напряжение, однако быстрее утомляются.

18. Все мышечные волокна одной двигательной единицы принадлежат к одному и тому же типу; большинство мышц содержат все три типа двигательных единиц.

19. Известны характеристики трех типов скелетных мышечных волокон.

20. Напряжение целой мышцы зависит от величины напряжения, развиваемого каждым волокном, и от количества активных волокон в мышце.

21. Мышцы, выполняющие тонкие движения, состоят из двигательных единиц с небольшим числом волокон, тогда как большие мышцы, обеспечивающие поддержание позы тела, состоят из гораздо более крупных двигательных единиц.

22. Быстрые гликолитические двигательные единицы содержат волокна большего диаметра и, кроме того, их двигательные единицы имеют более значительное число волокон.

23. Повышение мышечного напряжения происходит прежде всего путем увеличения количества активных двигательных единиц, т.е. их вовлечения. В начале сокращения первыми вовлекаются медленные оксидативные двигательные единицы, затем быстрые оксидативные и, наконец, уже при очень интенсивном сокращении, быстрые гликолитические единицы.

24. Вовлечение двигательных единиц сопровождается повышением скорости, с которой мышца перемещает нагрузку.

25. Силу и утомляемость мышцы можно изменить посредством тренировки:

- продолжительные упражнения низкой интенсивности повышают способность мышечных волокон к образованию АТФ окислительным (аэробным) путем. Это происходит благодаря увеличению количества митохондрий и кровеносных сосудов в мышце. В итоге возрастает выносливость мышцы;

- кратковременные упражнения высокой интенсивности увеличивают диаметр волокон вследствие повышения синтеза актина и миозина. В итоге возрастает мышечная сила.

26. Движения суставов осуществляются посредством двух антагонистических групп мышц: сгибателей и разгибателей.

27. Мышцы вместе с костями представляют собой системы рычагов; чтобы конечность могла удерживать груз, изометрическое напряжение мышцы должно существенно превысить массу этого груза, зато скорость перемещения плеча рычага гораздо больше, чем скорость укорочения мышцы.

Гладкие мышцы

1. Гладкие мышцы можно классифицировать на две большие группы: унитарные гладкие мышцы и мультиунитарные гладкие мышцы.

2. Гладкомышечные волокна - веретенообразные клетки без поперечной исчерченности, с одним ядром, способны к делению. Они содержат актиновые и миозиновые филаменты и сокращаются посредством механизма скользящих нитей.

3. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме ведет к связыванию Ca^{2+} с кальмодулином. Затем комплекс Ca^{2+} -кальмодулин связывается с киназой легких цепей миозина, активируя этот фермент, фосфорилирующий миозин. Только после фосфорилирования

гладкомышечный миозин может связываться с актином и осуществлять циклические движения поперечных мостиков.

4. Миозин гладких мышц гидролизует АТФ с относительно низкой скоростью, поэтому гладкие мышцы укорачиваются гораздо медленнее, чем поперечно-полосатые. Однако напряжение в расчете на единицу площади поперечного сечения для гладкой мышцы такое же, как для поперечно-полосатой.

5. Ионы Ca^{2+} , инициирующие сокращение гладкой мышцы, поступают из двух источников: саркоплазматического ретикулума и внеклеточной среды. В результате

открывания кальциевых каналов плазматической мембраны и саркоплазматического ретикула, которое опосредуется различными факторами, Ca^{2+} поступает в цитоплазму.

6. Большинство стимулирующих факторов повышают цитоплазматическую концентрацию Ca^{2+} не настолько, чтобы произошла активация всех поперечных мостиков клетки. Именно поэтому факторы, повышающие концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме, могут усиливать напряжение гладкой мышцы.

7. Существуют определенные типы стимулов, вызывающих сокращение гладкой мышцы благодаря открыванию кальциевых каналов плазматической мембраны и саркоплазматического ретикула.

8. В плазматической мембране большинства гладкомышечных клеток (но не всех) при ее деполяризации могут генерироваться потенциалы действия. Восходящая фаза потенциала действия гладкой мышцы обусловлена входом Ca^{2+} в клетку через открывшиеся кальциевые каналы.

9. В некоторых гладких мышцах потенциалы действия генерируются спонтанно, при отсутствии внешних стимулов. Это происходит благодаря тому, что в плазматической мембране периодически возникают пейсмекерные потенциалы, деполяризующие мембрану до порогового уровня.

10. Гладкомышечные клетки лишены специализированных концевых пластинок. Некоторые гладкомышечные волокна подвергаются действию нейромедиаторов, высвобождаемых из варикозных утолщений одиночной ветви нерва, причем каждое волокно может находиться под влиянием нейромедиаторов более чем одного нейрона. Действие нейромедиаторов на сокращения гладких мышц может быть возбуждающим либо тормозным.

Мышца сердца

1. Потенциалы действия с быстрым ответом регистрируются от предсердных и желудочковых волокон миокарда и от специализированных волокон проводящей системы желудочков (волокна Пуркинье). Потенциал действия характеризуется большой амплитудой, крутым нарастанием и относительно длинным плато.

2. Потенциалы действия с медленным ответом регистрируются в клетках SA- и AV-узлов и в аномальных кардиомиоцитах, которые были частично деполяризованы. Потенциал действия характеризуется менее негативным потенциалом покоя, меньшей амплитудой, менее крутым нарастанием и более коротким плато, чем потенциал действия с быстрым ответом. Нарастание генерируется за счет активации Ca^{2+} -каналов.

3. Потенциалы действия характеризуются эффективным рефрактерным периодом (фаза абсолютной рефрактерности).

4. Автоматия характерна для некоторых клеток SA- и AV-узлов и для клеток проводящей системы желудочков. Признаком автоматии служит медленная деполяризация мембраны в течение фазы 4 (медленная диастолическая деполяризация).

5. В норме SA-узел инициирует импульс, вызывающий сокращение сердца. Этот импульс распространяется из SA-узла по ткани предсердий и в конечном счете достигает AV-узла. После задержки в AV-узле сердечный импульс распространяется по желудочкам.

6. Увеличение длины волокон миокарда, как бывает при увеличенном желудочковом наполнении (при преднагрузке) во время диастолы, вызывает более сильное сокращение желудочков. Соотношение между длиной волокон и силой сокращения известно как соотношение Франка-Старлинга или как закон сердца Франка-Старлинга.

7. Несмотря на то, что миокард состоит из отдельных клеток, отделенных друг от друга мембранами, кардиомиоциты, из которых состоят желудочки, сокращаются почти в унисон, как и кардиомиоциты предсердий. Миокард функционирует как синцитий с реакцией типа «все или ничего» при возбуждении. Проведение возбуждения от клетки к клетке осуществляется через высоко проницаемые контакты - *gap junctions*, которыми соединены цитозоли смежных клеток.

Рис. 4-2. Общие представления о строении различных мышц (см. табл.)

8. При возбуждении потенциалуправляемые кальциевые каналы открываются, и внеклеточный Ca^{2+} поступает в клетку. Приток Ca^{2+} способствует высвобождению Ca^{2+} из саркоплазматического ретикула. Возросшая концентрация внутриклеточного Ca^{2+} вызывает сокращение миофиламентов. Расслабление сопровождается восстановлением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} до уровня в состоянии покоя путем активного закачивания Ca^{2+} назад в саркоплазматический ретикулум и обмена Ca^{2+} на внеклеточный Na^+ через сарколемму.

9. Скорость и сила сокращений зависят от внутриклеточной концентрации свободных ионов

кальция. Сила и скорость обратно пропорциональны друг другу, так что при отсутствии нагрузки скорость максимальна. Во время изоволюмического сокращения, когда нет внешнего укорочения, общая нагрузка максимальна, а скорость равна нулю.

10. При сокращении желудочков растягивание мышечных волокон кровью во время его наполнения служит преднагрузкой. Постнагрузкой является аортальное давление, преодолевая которое левый желудочек выталкивает кровь.

11. Сократительная способность отражает работу сердца при заданных величинах преднагрузки и постнагрузки.

Характеристики	Скелетные мышцы	Гладкие мышцы		Сердечная мышца
		Унитарные	Мультиунитарные	
Толстые и тонкие	Да	Да	Да	Да
Саркомеры – исчерченность	Да	Нет	Нет	Да
Поперечные трубочки	Да	Нет	Нет	Да
Саркоплазматический ретикулум (СПР) *	++++	+	+	++
<i>gap junction</i>	Нет	Да	Мало	Да
Источники поступления Ca^{2+}	СПР	СПР и внеклеточная среда	СПР и внеклеточная среда	СПР и внеклеточная среда
Белок, регулируемый Ca^{2+}	Тропонин	Миозин	Миозин	Тропонин
Скорость сокращения	Быстрая – медленная	Очень медленная	Очень медленная	Медленная
Спонтанное генерирование потенциалов действия пейсмейкерами	Нет	Да	Нет	Да – для определенных волокон; нет – для большинства волокон
Тонус (постоянное низкое напряжение при отсутствии внешних стимулов)	Нет	Да	Нет	Нет
Эффект раздражения нерва	Возбуждение	Возбуждение или угнетение	Возбуждение или угнетение	Возбуждение или угнетение
Физиологическое влияние гормонов на возбудимость и сокращение	Нет	Да	Да	Да
Сокращение в ответ на растяжение волокна	Нет	Да	Нет	Нет

* Число знаков «плюс» (+) указывает на относительные размеры саркоплазматического ретикулума в мышцах конкретного типа.

Физиология скелетных мышц

Понятие скелетная, или поперечно-полосатая мышца относится к группе мышечных волокон, связанных соединительной тканью (рис. 4-3 А). Обычно мышцы прикреплены к костям пучками коллагеновых волокон - сухожилиями, находящимися на обоих концах мышцы. В некоторых мышцах одиночные волокна имеют такую же протяженность, как и вся мышца, но в большинстве случаев волокна короче и часто располагаются под углом к продольной оси мышцы. Есть очень длинные сухожилия, они прикреплены к кости, удаленной от конца мышцы. Например, некоторые мышцы, осуществляющие движения пальцев рук, находятся в предплечье; шевеля пальцами, мы чувствуем, как двигаются мышцы кисти. Эти мышцы соединены с пальцами посредством длинных сухожилий.

При изучении с помощью светового микроскопа, основной характеристикой волокон скелетной мышцы оказалось чередование светлых и темных полос, поперечных по отношению к длинной оси волокна. Поэтому скелетные мышцы были названы поперечно-полосатыми.

Поперечная исчерченность волокон скелетной мышцы обусловлена особым распределением в их цитоплазме многочисленных толстых и тонких «нитей» (филаментов), объединяющихся в цилиндрические пучки диаметром 1-2 мкм - миофибриллы (рис. 4-3 Б). Мышечное волокно практически заполнено миофибриллами, они тянутся по всей его длине и на обоих его концах соединены с сухожилиями.

Толстые и тонкие филаменты образуют периодический рисунок вдоль каждой миофибриллы. Толстые филаменты состоят почти целиком из сократительного белка миозина. Тонкие филаменты (их толщина равна примерно половине диаметра толстого филамента) содержат сократительный белок актин, а также два других белка - тропонин и тропомиозин, играющих важную роль в регуляции сокращения (см. ниже).

Толстые филаменты сосредоточены в средней части каждого саркомера, где они лежат параллельно друг другу; эта область выглядит как широкая темная (анизотропная) полоса, называемая А-полосой. В обеих половинах саркомера находится по набору тонких филаментов. Один конец каждого из них прикреплен к так называемой Z-пластинке (или Z-линии, или Z-полосе) - сети из переплетающихся белковых молекул, - а другой конец перекрывается с толстыми филаментами. Саркомер ограничен двумя последовательно расположенными Z-полосами. Таким образом, тонкие филаменты двух соседних саркомеров закреплены на двух сторонах каждой Z-полосы.

Светлая (изотропная) полоса - так называемая I-полоса - расположена между краями А-полос двух соседних саркомеров и состоит из тех участков тонких филаментов, которые не перекрываются с толстыми филаментами. Z-полоса делит I-полосу пополам.

В пределах А-полосы каждого саркомера различают еще две полоски. В центре А-полосы видна узкая светлая полоска - Н-зона. Она соответствует промежутку между противостоящими друг другу концами двух наборов тонких филаментов каждого саркомера, т.е. включает только центральные части толстых филаментов. Посередине Н-зоны находится совсем тонкая темная М-линия. Это сеть белков, соединяющих центральные части толстых филаментов. Кроме того, от Z-полосы к М-линии идут филаменты белка титина, связанные одновременно с белками М-линии и с толстыми филаментами. М-линия и титиновые филаменты поддерживают упорядоченную организацию толстых филаментов в середине каждого саркомера. Таким образом, толстые и тонкие филаменты не являются свободными, незакрепленными внутриклеточными структурами.

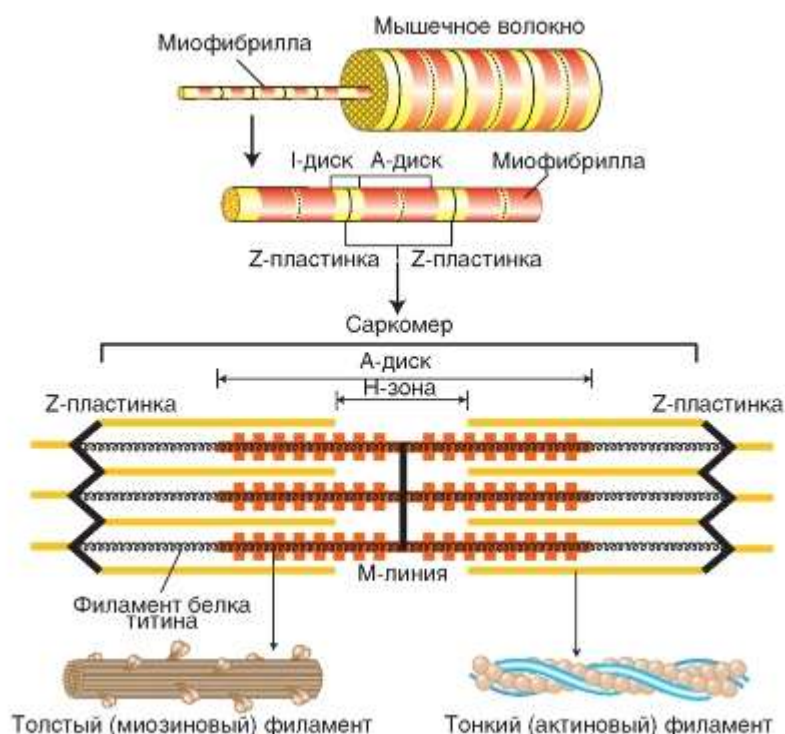
Рис. 4-3. Структура скелетных мышц.

А - организация цилиндрических волокон в скелетной мышце, прикрепленной к костям сухожилиями. Б - структурная организация филаментов в волокне скелетной мышцы, создающая картину поперечных полос. Показаны многочисленные миофибриллы в одиночном мышечном волокне, а также организация толстых и тонких филаментов в саркомере

А



Б



Молекула актина

Это глобулярный белок, состоящий из одного полипептида, который полимеризуется с другими молекулами актина и образует две цепи, обвивающие друг друга (рис. 4-4 А). Такая двойная спираль представляет собой остов тонкого филамента. На каждой молекуле

актина есть участок связывания миозина. В покое мышечном волокне взаимодействие между актином и миозином предотвращают два белка - тропонин и тропомиозин (рис. 4-4 Б).

Тропомиозин - стержневидная молекула из двух полипептидов, обвивающихся друг около друга; молекула соответствует в длину примерно семи мономерам актина. Цепи из молекул тропомиозина, уложенные конец в конец, располагаются вдоль всего тонкого филамента. Молекулы тропомиозина частично прикрывают участки связывания каждой молекулы актина, мешая контакту миозина с актином. В таком блокирующем положении молекула тропомиозина удерживается тропонином.

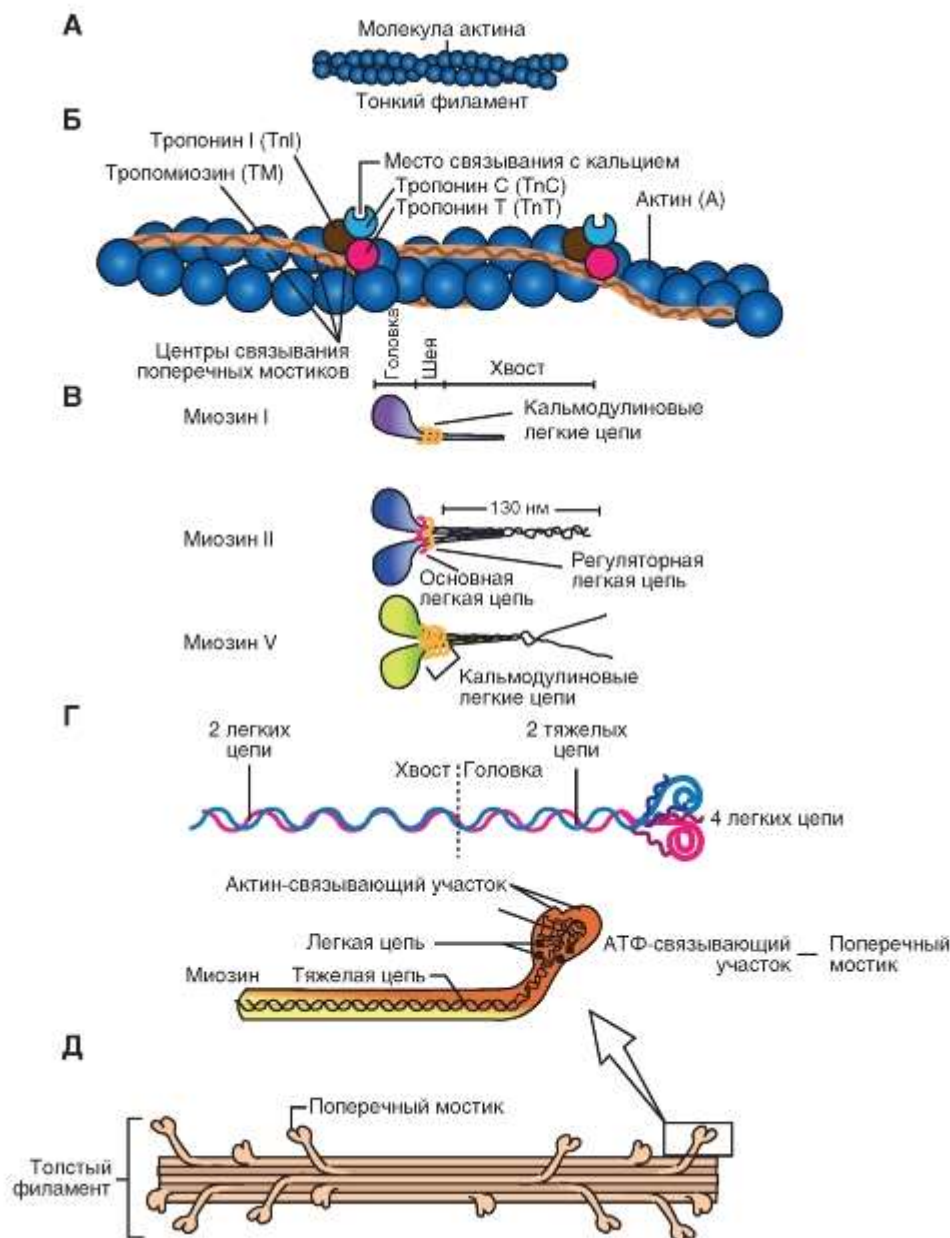
Тропонин - гетеротримерный белок. Он состоит из тропонина Т (отвечает за связывание с одиночной молекулой тропомиозина), тропонина С (связывает ион Ca^{2+}) и тропонина I (связывает актин и ингибирует сокращение). Каждая молекула тропомиозина связана с одной гетеротримерной молекулой тропонина, которая регулирует доступ к участкам связывания миозина на семи мономерах актина, прилегающих к молекуле тропомиозина.

Миозин

Это единое название большой семьи протеинов, имеющих определенные отличия в клетках разных тканей. Миозин присутствует у всех эукариотов. Около 60 лет назад было известно два типа миозина, которые сейчас называют миозин I и миозин II. Миозин II был первым из числа открытых миозинов, и именно он принимает участие в мышечном сокращении. Позднее были открыты миозин I и миозин V (рис. 4-4 В). В последнее время показано, что миозин II участвует в мышечном сокращении, тогда как миозин I и миозин V вовлечены в работу подмембранного (кортикального) цитоскелета. В настоящее время идентифицировано более 10 классов миозина. На рисунке 4-4 Г показано два варианта схемы строения миозина, который состоит из головки, шейки и хвоста. Молекула миозина состоит из двух больших полипептидов (тяжелых цепей) и четырех меньших (легких цепей). Эти полипептиды составляют молекулу с двумя глобулярными «головками», которые содержат оба вида цепей, и длинным стержнем («хвостом») из двух переплетенных тяжелых цепей. Хвост каждой молекулы миозина располагается вдоль оси толстого филамента, а две глобулярные головки выступают по бокам, их иначе называют поперечными мостиками. На каждой глобулярной головке находятся по два участка связывания: для актина и для АТФ. Участки связывания АТФ обладают также свойствами фермента АТФазы, гидролизующей связанную молекулу АТФ.

На рисунке 4-4 Д представлена упаковка молекул миозина. Выступающие головки миозина и есть поперечные мостики.

Рис. 4-4. Строение актина и миозина



Саркоплазматический ретикулум

В состоянии покоя в мышечном волокне концентрация свободного, ионизированного Ca^{2+} в цитоплазме вокруг толстых и тонких филаментов очень низка, около 10^{-7} моль/л. При такой концентрации ионы Ca^{2+} занимают очень небольшое количество участков связывания на молекулах тропонина (тропонина C), поэтому тропомиозин блокирует связывание с актином поперечных мостиков. После потенциала действия концентрация ионов Ca^{2+} в цитоплазме быстро возрастает, и они связываются с тропонином, устраняя блокирующий эффект тропомиозина и инициируя цикл поперечных мостиков. Источником поступления Ca^{2+} в цитоплазму служит саркоплазматический ретикулум мышечного волокна.

Саркоплазматический ретикулум мышц гомологичен эндоплазматическому ретикулуму других клеток. Он располагается вокруг каждой миофибриллы наподобие «рваного рукава», сегментами которого окружены А- и I-полосы. Концевые части каждого сегмента расширяются в виде так называемых латеральных мешков (терминальных цистерн), соединенных друг с другом серией более тонких трубок. В латеральных мешках

депонируется Ca^{2+} , высвобождающийся после возбуждения плазматической мембраны (рис. 4-5 А).

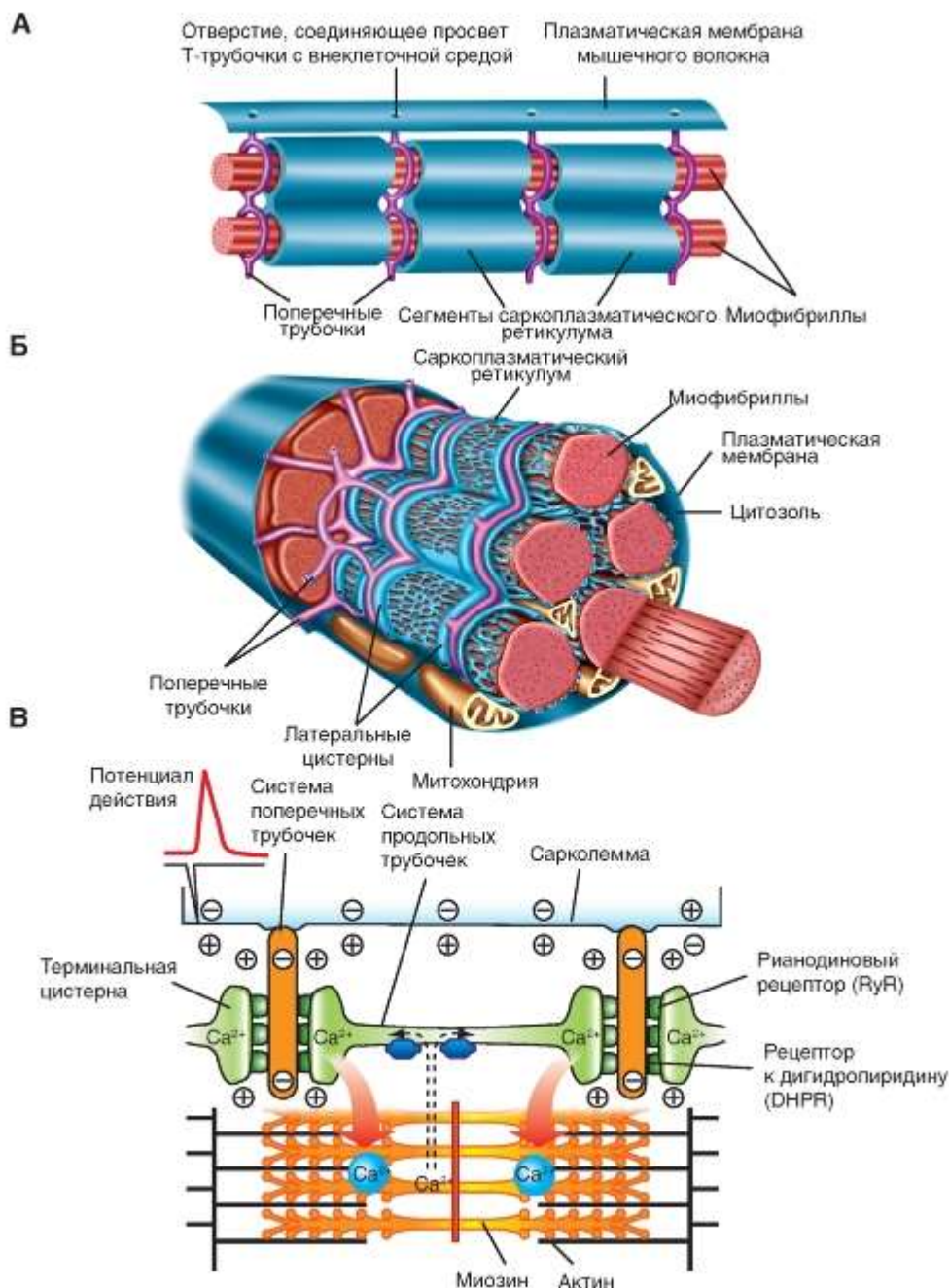
Отдельную систему составляют поперечные трубочки (Т-трубочки), которые пересекают мышечное волокно на границе полос А-І, проходят между латеральными мешками двух смежных саркомеров и выходят на поверхность волокна, составляя единое целое с плазматической мембраной. Просвет Т-трубочки заполнен внеклеточной жидкостью, окружающей мышечное волокно (рис. 4-5 Б). Мембрана Т-трубочек, так же как плазматическая мембрана, способна к проведению потенциала действия. Возникнув в плазматической мембране (рис. 4-5 В), потенциал действия быстро распространяется по поверхности волокна и по мембране Т-трубочек вглубь клетки. Достигнув области Т-трубочек, прилегающей к латеральным мешкам, потенциал действия активирует потенциалзависимые «воротные» белки мембраны Т-трубочек, физически или химически сопряженные с кальциевыми каналами мембраны латеральных мешков. Таким образом, деполяризация мембраны Т-трубочек, обусловленная потенциалом действия, приводит к открыванию кальциевых каналов мембраны латеральных мешков, содержащих Ca^{2+} в высокой концентрации, и ионы Ca^{2+} выходят в цитоплазму. Повышение цитоплазматического уровня Ca^{2+} обычно бывает достаточным для активации всех поперечных мостиков мышечного волокна.

Процесс сокращения продолжается, пока ионы Ca^{2+} связаны с тропонином, т.е. до тех пор, пока их концентрация в цитоплазме не вернется к низкому исходному значению. Мембрана саркоплазматического ретикулума содержит Са-АТФазу - интегральный белок, осуществляющий активный транспорт Ca^{2+} из цитоплазмы обратно в полость саркоплазматического ретикулума. Как только что говорилось, Ca^{2+} высвобождается из ретикулума в результате распространения потенциала действия по Т-трубочкам; для возвращения Ca^{2+} в ретикулум нужно гораздо больше времени, чем для его выхода. Именно поэтому, повышенная концентрация Ca^{2+} в цитоплазме сохраняется в течение некоторого времени, и сокращение мышечного волокна продолжается после завершения потенциала действия.

Подведем итог. Сокращение обусловлено высвобождением ионов Ca^{2+} , хранящихся в саркоплазматическом ретикулуме. Когда Ca^{2+} поступает обратно в ретикулум, сокращение заканчивается и начинается расслабление.

Рис. 4-5. Саркоплазматический ретикулум и его роль в механизме сокращения мышцы.

А - схема организации саркоплазматического ретикулума, поперечных трубочек и миофибрилл. Б - схема анатомической структуры поперечных трубочек и саркоплазматического ретикулума в индивидуальном волокне скелетной мышцы. В - роль саркоплазматического ретикулума в механизме сокращения скелетной мышцы



Электромеханическое сопряжение

Это последовательность процессов, в результате которых потенциал действия плазматической мембраны мышечного волокна приводит к запуску сокращения мышцы или к так называемому циклу поперечных мостиков, который будет продемонстрирован далее.

Плазматическая мембрана скелетных мышц электрически возбудима и способна генерировать распространяющийся потенциал действия посредством механизма, аналогичного тому, который действует в нервных клетках. Потенциал действия в волокне скелетной мышцы длится 1-2 мс и заканчивается раньше, чем появятся какие-либо признаки механической активности (рис. 4-6 А). Начавшаяся механическая активность может продолжаться более 100 мс. Электрическая активность плазматической мембраны не оказывает прямого влияния на сократительные белки, а вызывает повышение

цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , которые продолжают активировать сократительный аппарат и после прекращения электрического процесса.

Сокращение мышц

В физиологии мышц термин «сокращение» не обязательно следует понимать как «укорочение». Прежде всего, рассматривается факт активации поперечных мостиков - участков генерирования силы в мышечном волокне. После сокращения механизм, инициирующий развитие силы, выключается.

Силу, с которой мышца, при ее сокращении, действует на предмет, называют мышечным напряжением (*tension*); сила действия предмета (обычно его массы) на мышцу - это нагрузка (*load*). Силы мышечного напряжения и нагрузки противодействуют друг другу. Приведет ли сила, генерируемая мышечным волокном, к его укорочению, зависит от относительных величин напряжения и нагрузки. Чтобы мышечное волокно укоротилось и таким образом переместило нагрузку, его напряжение должно быть больше противодействующей нагрузки.

Если мышца развивает напряжение, но не укорачивается (и не удлиняется), сокращение называется изометрическим (длина мышцы постоянна). Такое сокращение происходит, когда мышца удерживает нагрузку в постоянном положении либо развивает силу по отношению к нагрузке, масса которой больше, чем мышечное напряжение. Если мышца укорачивается, а нагрузка на нее остается постоянной, сокращение называется изотоническим (напряжение мышцы постоянно).

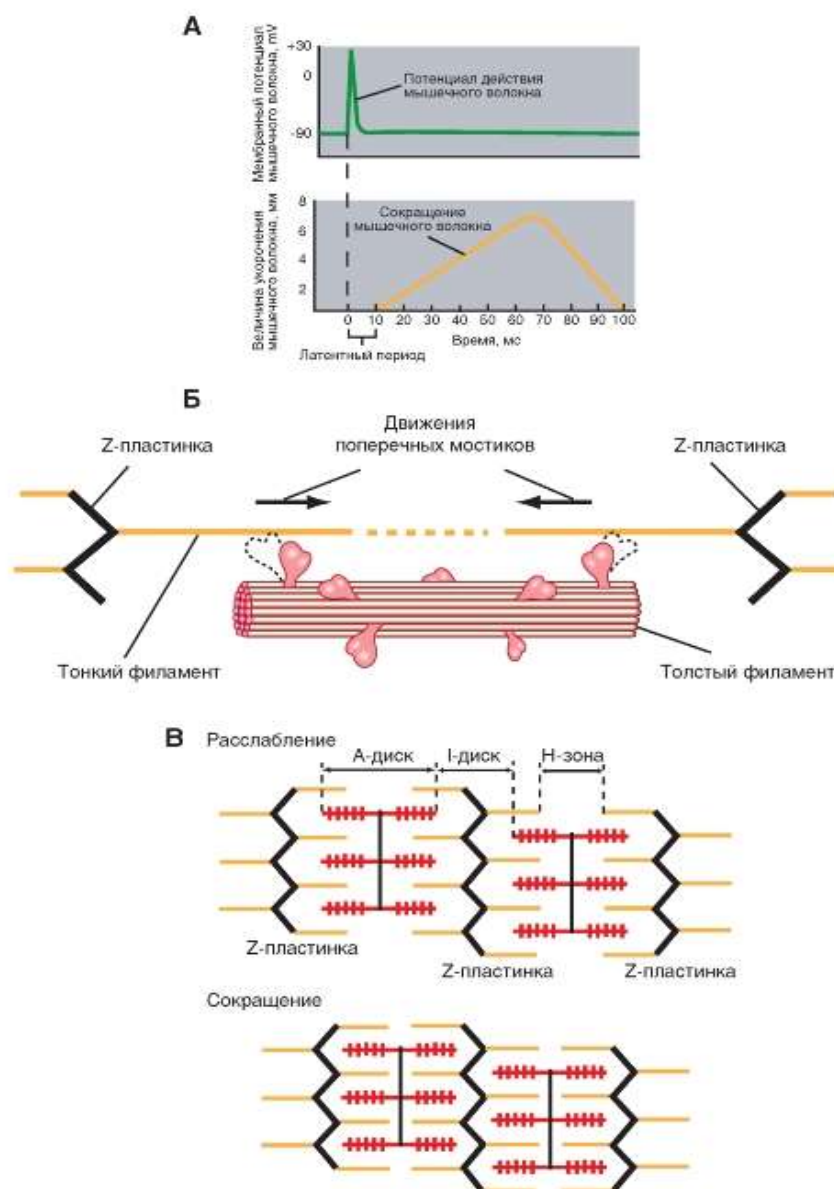
Модель скользящих нитей

При укорочении волокна каждый поперечный мостик, прикрепившийся к тонкому филаменту, совершает поворот наподобие вращения лодочного весла. Вращательные движения множества поперечных мостиков подтягивают тонкие филаменты от обоих краев А-полосы к ее середине, и саркомер укорачивается (рис. 4-6 Б). Один «гребок» поперечного мостика создает очень маленькое перемещение тонкого филамента относительно толстого. Однако, за весь период активного состояния (возбуждения) мышечного волокна каждый поперечный мостик повторяет свое вращательное движение много раз, обеспечивая значительное смещение миофиламентов. Детальный молекулярный механизм этого явления будет рассматриваться далее.

Во время генерирования силы, укорачивающей мышечное волокно, перекрывающиеся толстые и тонкие филаменты каждого саркомера, подтягиваемые движениями поперечных мостиков, сдвигаются друг относительно друга. Длина толстых и тонких филаментов при укорочении саркомера не изменяется (рис. 4-6 В). Этот механизм мышечного сокращения известен как модель скользящих нитей.

Рис. 4-6. Феномен электромеханического сопряжения.

А - соотношение между временным ходом потенциала действия в мышечном волокне и возникающим в результате этого сокращением мышечного волокна с последующим его расслаблением. Б - поперечные мостики толстых филаментов, связываясь с актином тонких филаментов, подвергаются конформационному изменению, благодаря которому тонкие филаменты подтягиваются к середине саркомера. (На схеме изображены лишь два из примерно 200 поперечных мостиков каждого толстого филамента). В - модель скользящих нитей. Скольжение перекрывающихся толстых и тонких филаментов друг относительно друга приводит к укорочению миофибриллы без изменений длины филаментов. I-диск и H-зона при этом уменьшаются



Специфические белки скелетной мышцы

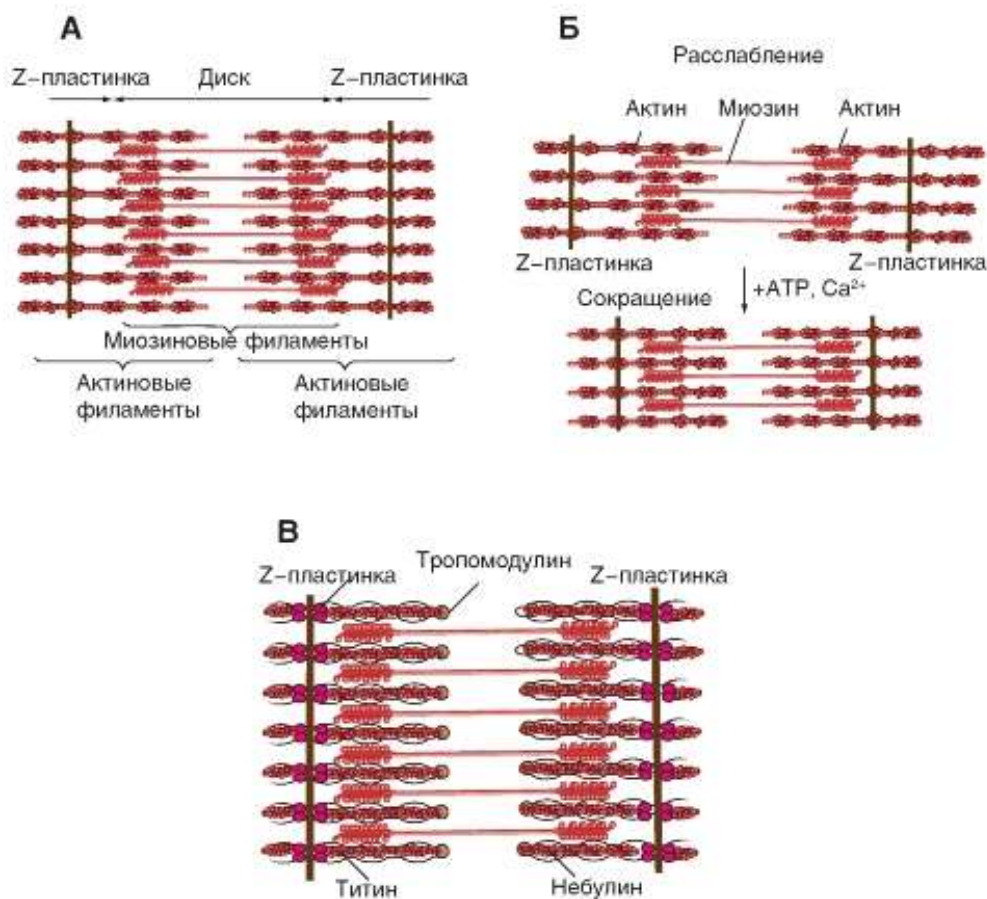
Как было отмечено, толстые и тонкие филаменты образуют периодический рисунок вдоль каждой миофибриллы. Регулярно повторяющийся элемент - саркомер. Толстые филаменты состоят почти целиком из сократительного белка миозина. Тонкие филаменты содержат сократительный белок актин, тропонин и тропомиозин. Толстые филаменты сосредоточены в средней части каждого саркомера, где они лежат параллельно друг другу. Эта область имеет вид широкой темной полосы, называемой А-полосой (рис. 4-7 А). В обеих половинах саркомера находится по набору тонких филаментов. Один конец каждого из них прикреплен к так называемой Z-полосе (или Z-линии) - сети из переплетающихся белковых молекул. Другой конец перекрывается с толстыми филаментами. Саркомер ограничен двумя последовательно расположенными Z-полосами. Таким образом, тонкие филаменты двух соседних саркомеров закреплены на двух сторонах каждой Z-полосы. Светлая полоса - I-полоса, расположена между краями А-полос двух соседних саркомеров и состоит из тех участков тонких филаментов, которые не перекрываются с толстыми филаментами. Z-полоса делит I-полосу пополам.

Два конца каждого толстого филамента молекулы миозина ориентированы в противоположных направлениях так, что концы их хвостов направлены по отношению к

центру филамента (рис. 4-7 Б). Благодаря этому при гребковых движениях поперечных мостиков прикрепившиеся к ним тонкие филаменты левой и правой половины саркомера проталкиваются к его середине, в результате саркомер укорачивается. То есть во время генерирования силы, укорачивающей мышечное волокно, перекрывающиеся толстые и тонкие филаменты каждого саркомера сдвигаются друг относительно друга, подтягиваемые движениями поперечных мостиков. Длина толстых и тонких филаментов при укорочении саркомера не изменяется (рис. 4-7 Б).

Известно, что в пределах А-полосы каждого саркомера различаются еще две полосы. В центре А-полосы видна узкая светлая полоска - Н-зона. Она соответствует промежутку между противостоящими друг другу концами двух наборов тонких филаментов каждого саркомера, т.е. включает только центральные части толстых филаментов. Посередине Н-зоны находится совсем тонкая темная М-линия. Это сеть белков, соединяющих центральные части толстых филаментов. На рис. 4-7 В показаны известные в настоящее время дополнительные белки. От Z-полосы к М-линии идут филаменты белка титина, связанные одновременно с белками М-линии и с толстыми филаментами. М-линия и титиновые филаменты поддерживают упорядоченную организацию толстых филаментов в середине каждого саркомера. Таким образом, толстые и тонкие филаменты не являются свободными, незакрепленными внутриклеточными структурами. Кроме того, на рис. 4-7 В показан белок CapZ, определяющий стабилизацию филаментов актина. Показан также тропомодулин. На рисунке представлен и гигантский протеин - небулин.

Рис. 4-7. Строение скелетной мышцы в норме (А), на фоне расслабления (Б) и сокращения (В). Дополнительные белки, найденные в скелетной мышце (Г)



Молекула актина и миозина

Тонкий филамент (рис. 4-8 А) состоит из актина, тропомиозина и тропонина. Основа тонкого филамента - двойная закрученная цепь α -спирального полимера молекулы актина. Иначе говоря, это две цепи, закрученные относительно друг друга. Такая двойная спираль представляет собой остов тонкого филамента. Каждый спиральный оборот единичной нити филамента, или F-актин, состоит из 13 единичных мономеров в виде глобул и равен в длину примерно 70 нм. На каждой единичной молекуле актина есть участок связывания миозина. F-актин связан с двумя важнейшими регуляторными актинсвязывающими белками - тропомиозином и тропонином. Эти белки в покое мышечном волокне предотвращают взаимодействие между актином и миозином. Коротко, молекулы тропомиозина частично закрывают участки связывания каждой единичной молекулы актина, мешая контакту миозина с актином. В таком состоянии блокирования участков связывания каждой единичной молекулы актина молекула тропомиозина удерживает тропонин. Рассмотрим тропомиозин и тропонин подробнее.

Тропомиозин - длинная молекула, состоящая из двух полипептидов, обвивающих друг друга. Молекула тропомиозина соответствует в длину примерно семи мономерам актина. Цепи из молекул тропомиозина, уложенные конец в конец, располагаются вдоль всего тонкого филамента. Молекулы тропомиозина частично прикрывают участки связывания каждой молекулы актина, блокируя возможность контакта миозина с актином. В таком блокирующем положении молекула тропомиозина удерживается тропонином.

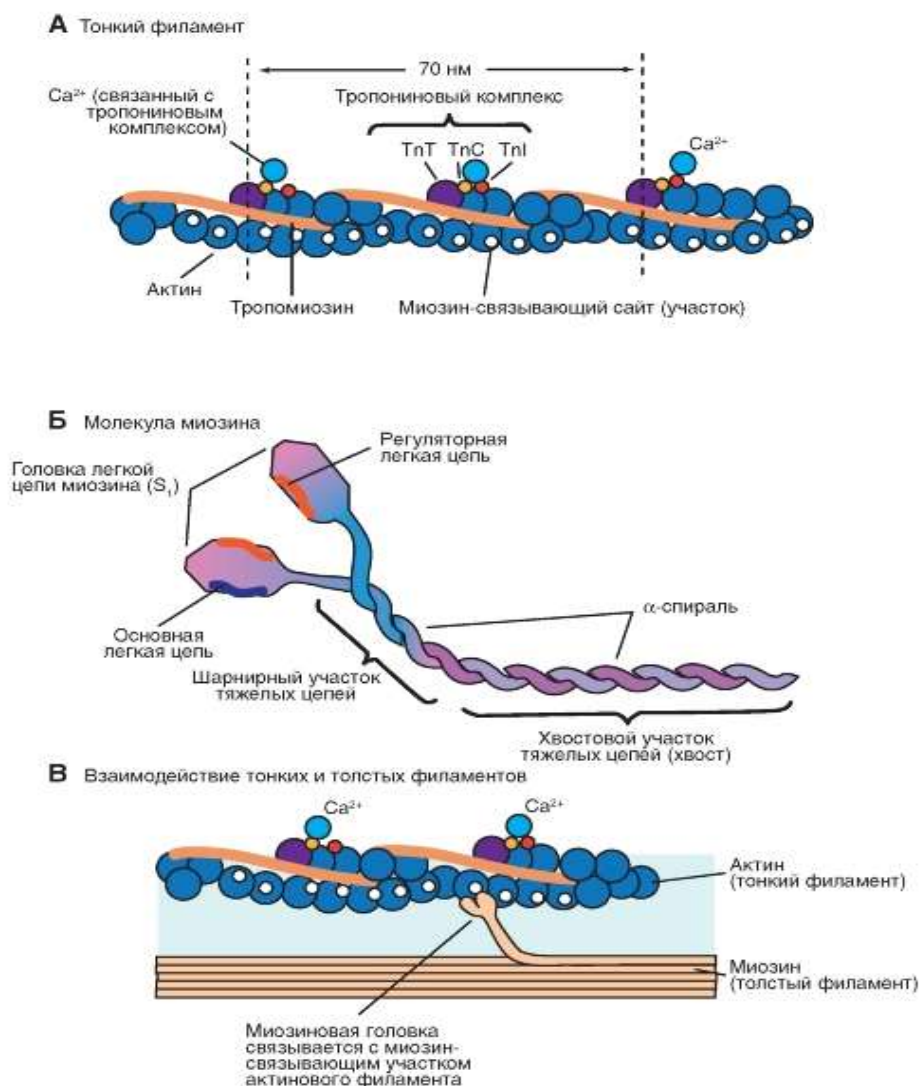
Тропонин - гетеротримерный белок. Он состоит из тропонина Т, который отвечает за связывание с одиночной молекулой тропомиозина, тропонина С, который связывает ион Ca^{2+} , и тропонина I, который связывает актин и ингибирует сокращение. Каждая молекула тропомиозина связана с одной гетеротримерной молекулой тропонина, регулирующей доступ к участкам связывания миозина на семи мономерах актина, прилегающих к молекуле тропомиозина.

Молекула миозина (рис. 4-8 Б) - единое название большой семьи протеинов, имеющих определенные отличия в клетках разных тканей. В мышечном сокращении участвует миозин II, открытый первым из числа всех миозинов. В целом, молекула миозина II состоит из двух больших полипептидов (так называемых тяжелых цепей) и четырех меньших (так называемых легких цепей). У миозина II две тяжелые цепи составляют молекулу, содержащую две глобулярные «головки» (по одной у каждого полипептида) и соответственно две незакрученные «шейки». В некоторой литературе шейку тяжелой цепи переводят как «плечо молекулы миозина». Далее два больших полипептида, т.е. две тяжелые цепи, начинают закручиваться относительно друг друга. Их начальный регион закручивания получил название «шарнирный регион тяжелых цепей». Затем следует длинный стержень из двух переплетенных тяжелых цепей, получивший название «хвост». Хвост каждой молекулы миозина располагается вдоль оси толстого филамента, а две глобулярные головки вместе с шейками и шарнирным регионом, выступающие по бокам, иначе называют «поперечными мостиками». На каждой глобулярной головке у миозина II находятся по две легкие цепи. Одна - так называемая легкая регуляторная цепь, другая - легкая основная цепь. Легкая основная цепь участвует в стабилизации головки миозина. Легкая регуляторная цепь регулирует активность фермента АТФазы миозина, гидролизующей связанную молекулу АТФ. Действие легкой регуляторной цепи миозина заключается в изменении регуляции посредством фосфорилирования с помощью Ca^{2+} -зависимой или Ca^{2+} -независимой киназы.

Взаимодействие тонкого филамента и одиночной пары головок от миозина толстого филамента показано на рис. 4-8 В.

Рис. 4-8. Молекулярная организация тонких и толстых филаментов.

А - тонкий филамент. Б - молекула миозина. В - взаимодействие тонкого и толстого филамента



Взаимодействие актина и миозина

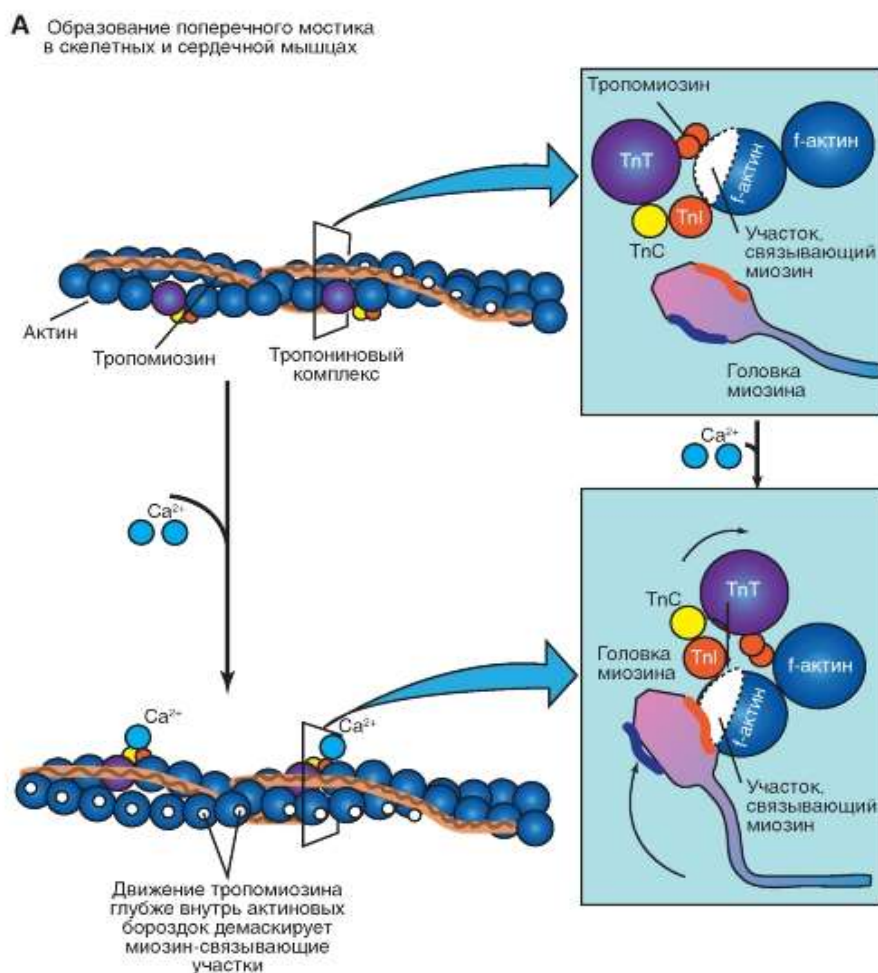
Рассмотрим вопрос, что позволяет поперечным мостикам, т.е. глобулярным головкам (вместе с шейками и шарнирным регионом), связываться с актином и начинать совершать определенное движение. Если говорить предельно коротко, то в основе мышечного сокращения лежит цикл, в котором головки миозина II связываются с участками связывания актина. Эти поперечные мостики создают искривление, что соответствует перемещению молекулы, после чего головки миозина отделяются от актина. Для этих циклов берется энергия гидролиза АТФ. Мышцы имеют механизмы регуляции циклов поперечных мостиков. Увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ инициирует продолжение формирования циклов поперечных мостиков. При возбуждении происходит увеличение $[Ca^{2+}]_{in}$ от уровня покоя (10^{-7} М и меньше) до более чем 10^{-5} М.

Начнем с того, что потенциал действия в волокне скелетной мышцы длится 1-2 мс и заканчивается раньше, чем появятся какие-либо признаки механической активности. Начавшаяся механическая активность может продолжаться более 100 мс. Электрическая активность плазматической мембраны не оказывает прямого влияния на сократительные белки, а вызывает повышение цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} , которые продолжают активировать сократительный аппарат и после прекращения электрического

процесса. То есть сокращение обусловлено высвобождением ионов Ca^{2+} , хранящихся в саркоплазматическом ретикулуме. Когда Ca^{2+} поступает обратно в ретикулум, сокращение заканчивается и начинается расслабление. Источником энергии для кальциевого насоса служит АТФ: это одна из трех главных функций АТФ в мышечном сокращении.

Итак, сокращение инициируется в результате увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$. Молекула гетеротримерного тропонина содержит ключевой Ca^{2+} -сенситивный регулятор - тропонин С. Каждая молекула тропонина С в скелетной мышце имеет два высокоаффинных Ca^{2+} -связывающих места, которые участвуют в связывании тропонина С с тонким филаментом. Связывание Ca^{2+} в этих высокоаффинных местах постоянно и не меняется в течение активности мышцы. Каждая молекула тропонина С в скелетной мышце имеет также два дополнительных низкоаффинных Ca^{2+} -связывающих места. Взаимодействие Ca^{2+} с ними индуцирует конформационные изменения в тропониновом комплексе, приводящие к двум эффектам. Первый эффект заключается в том, что С-терминаль ингибиторного тропонина I двигается в направлении от центра связывания актина с миозином (расположенном на актине), тем самым осуществляя движение молекулы тропомиозина также в сторону от центра связывания актина с миозином (расположенном на актине). Другой эффект осуществляется через тропонин Т, и заключается в выталкивании тропомиозина от центра связывания актина с миозином в так называемый актиновый желобок. Это приводит к тому, что центр связывания с миозином на актине открывается, и головка миозина может взаимодействовать с актином, создавая цикл поперечных мостиков.

Рис. 4-9. Принципы взаимодействия актина и миозина в скелетной и сердечной мышцах



Механизм сокращения

Последовательность событий, начиная от связывания поперечного мостика с тонким филаментом и до момента, когда система готова к повторению процесса, называется рабочим циклом поперечных мостиков. Каждый цикл состоит из четырех основных фаз. Фаза 1 - головка миозина прочно связана с молекулой актина в актомиозиновый комплекс. Для отделения головки миозина в цитозоле необходим АТФ, и его подход к миозину показан стрелкой на схеме. Фаза 2 - если головка миозина связывается с АТФ, то уменьшается аффинность головки миозина к актину. Из-за уменьшения аффинности головка миозина отделяется от молекулы актина. При устранении действия на головку миозина АТФ цикл продолжается дальше.

В мышце это происходит, исключительно, благодаря расщеплению АТФ до АДФ+Р_i в результате работы фермента АТФазы миозина. Этот шаг зависит от наличия Mg²⁺. Фаза 3 - если на головке миозина после расщепления АТФ на АДФ и Р_i оба, АДФ и Р_i, связаны. При этом головка миозина выпрямляется. Аффинность образования актомиозинового комплекса опять повышается, и головка миозина может вновь присоединить молекулу актина со слабой связью. Фаза 4 - инициация слабой связи переходит быстро в более сильную связь с головкой миозина, нагруженной АДФ. Переход в это состояние представляет собой собственно ступень генерации силы. Этот процесс объясняют вращением головки миозина, благодаря которой поворот миозина осуществляет сдвиг на шаг филамент актина.

В цикле поперечных мостиков АТФ выполняет две разные роли:

- 1) гидролиз АТФ поставляет энергию для движения поперечного мостика;
- 2) связывание (но не гидролиз) АТФ с миозином сопровождается отделением миозина от актина и создает возможность повторения цикла поперечных мостиков.

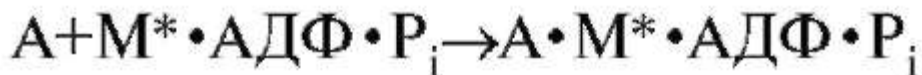
Химические и физические явления во время четырех стадий цикла поперечных мостиков можно представить иначе. Молекула АТФ, связанная с миозином, расщепляется с освобождением химической энергии и образованием высокоэнергетической конформации миозина поперечного мостика; с этой формой миозина (М*) остаются связанными продукты гидролиза АТФ-АДФ и неорганический фосфат (Р_i).

Энергию активной конформации миозина можно сравнить с потенциальной энергией растянутой пружины.



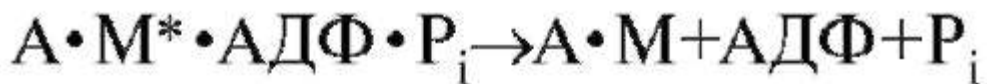
Гидролиз АТФ.

Далее происходит связывание высокоэнергетической формы миозина с актином (А) тонкого филамента:



Связывание актина.

При связывании высокоэнергетической формы миозина с актином запускается освобождение напряженной конформации высокоэнергетического поперечного мостика; в результате связанный с актином поперечный мостик совершает свое вращательное движение и одновременно теряет АДФ и Р_i.



Движение поперечного мостика.

Процесс последовательного получения и освобождения энергии миозином можно сравнить с работой мышеловки. В ней энергия запасается при растягивании пружины (в мышце - при гидролизе АТФ), а освобождается при отпуске пружины (в мышце - при связывании миозина с актином).

Во время движения поперечного мостика миозин очень прочно прикреплен к актину; только после разрыва этой связи он может снова получить энергию и повторить цикл. Связь между актином и миозином разрывается при соединении с миозином новой молекулы АТФ.

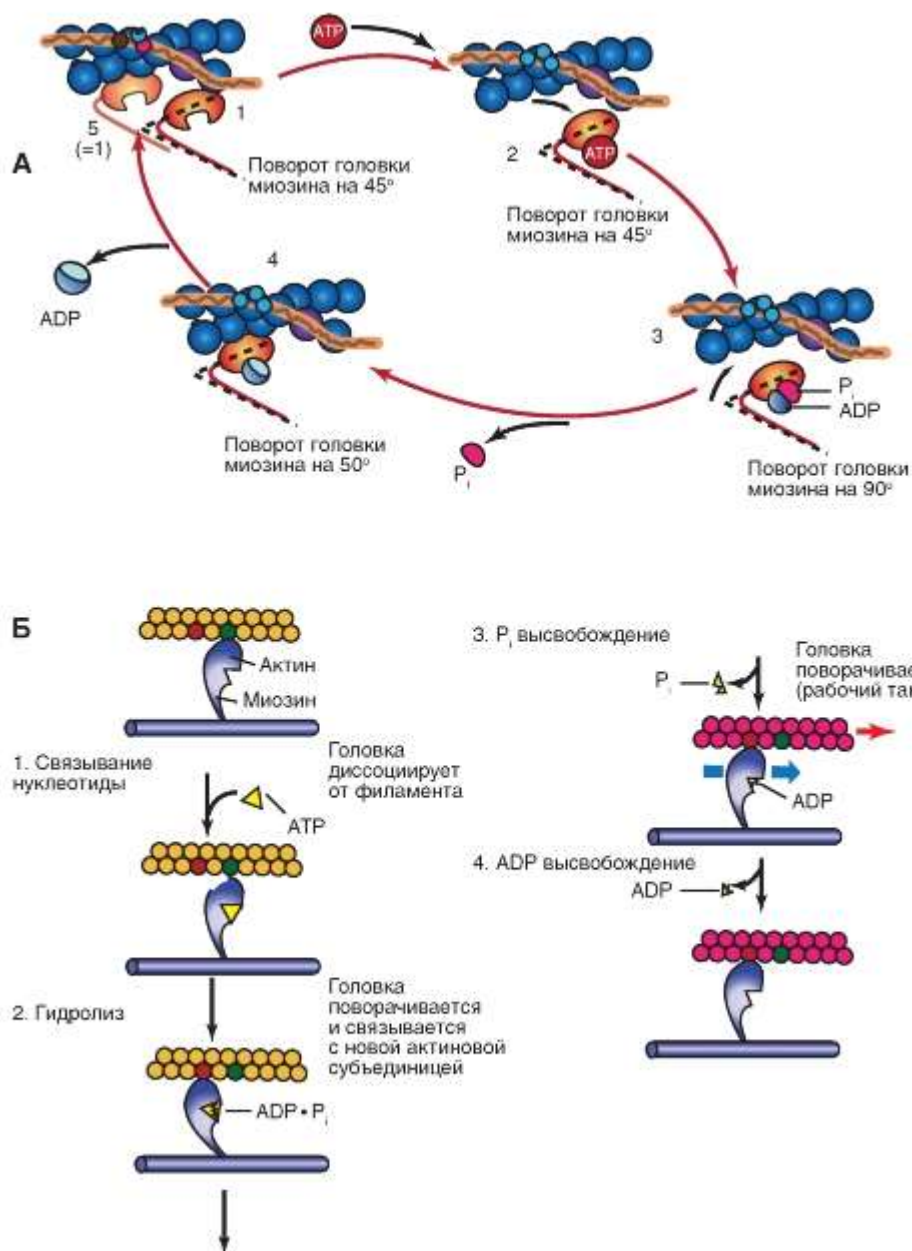


Диссоциация поперечного мостика от актина.

Обеспечиваемое АТФ разделение актина и миозина - пример аллостерической регуляции активности белка. Связывание АТФ с одним участком миозина снижает сродство его молекулы к актину, связанному с другим участком. Следовательно, АТФ действует как модулятор, регулирующий связывание актина с миозином. Отметим, что на этой стадии АТФ не расщепляется, т.е. служит не источником энергии, а только модулирующей молекулой, которая обеспечивает аллостерическую модуляцию миозиновой головки и тем самым ослабляет связь миозина с актином.

Рис. 4-10. Механизм сокращения. Представлен рабочий цикл поперечных мостиков - головки миозина (вместе с шейкой и шарнирным регионом).

На панели (А) процесс представлен в виде замкнутого цикла из четырех фаз. На панели (Б) процесс представлен в виде последовательных шагов более детально



Одиночное сокращение мышцы

Если мышца развивает напряжение, но не укорачивается (и не удлиняется), сокращение называется **изометрическим** (длина мышцы постоянна). Такое сокращение происходит, когда мышца удерживает нагрузку в постоянном положении, либо развивает силу по отношению к нагрузке, масса которой больше, чем мышечное напряжение. Если мышца укорачивается, а нагрузка на нее остается постоянной, сокращение называется **изотоническим** (напряжение мышцы постоянно).

Механический ответ отдельного мышечного волокна на одиночный потенциал действия называется **одиночным сокращением** (*twitch*). Основные характеристики одиночного изометрического сокращения показаны на рис. 4-11 А. Начало мышечного напряжения запаздывает на несколько миллисекунд по отношению к потенциалу действия. В течение этого латентного периода проходят все этапы электромеханического сопряжения. Интервал от начала развития напряжения до момента его максимума это время сокращения. Оно различно для разных типов волокон скелетных мышц. Время сокращения быстрых волокон не превышает 10 мс, тогда как для более медленных

волокон оно не меньше 100 мс. Длительность сокращения определяется тем, как долго цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} остается повышенной, обеспечивая продолжение циклической активности поперечных мостиков. Время сокращения обусловлено активностью Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума, которая в быстрых волокнах выше, чем в медленных.

Характеристики изотонического сокращения зависят также от массы поднимаемой нагрузки (рис. 4-11 Б), а именно, при более тяжелой нагрузке:

- 1) латентный период продолжительнее;
- 2) скорость укорочения (величина укорочения мышцы в единицу времени), длительность сокращения и величина укорочения мышцы - меньше.

Сравнение одиночных сокращений одного и того же мышечного волокна при разных режимах его деятельности показывает (рис. 4-11 В), что латентный период больше для изотонического сокращения, чем для изометрического, тогда как длительность механического процесса меньше в случае изотонического сокращения (т.е. при укорочении), чем изометрического (т.е. при генерировании силы).

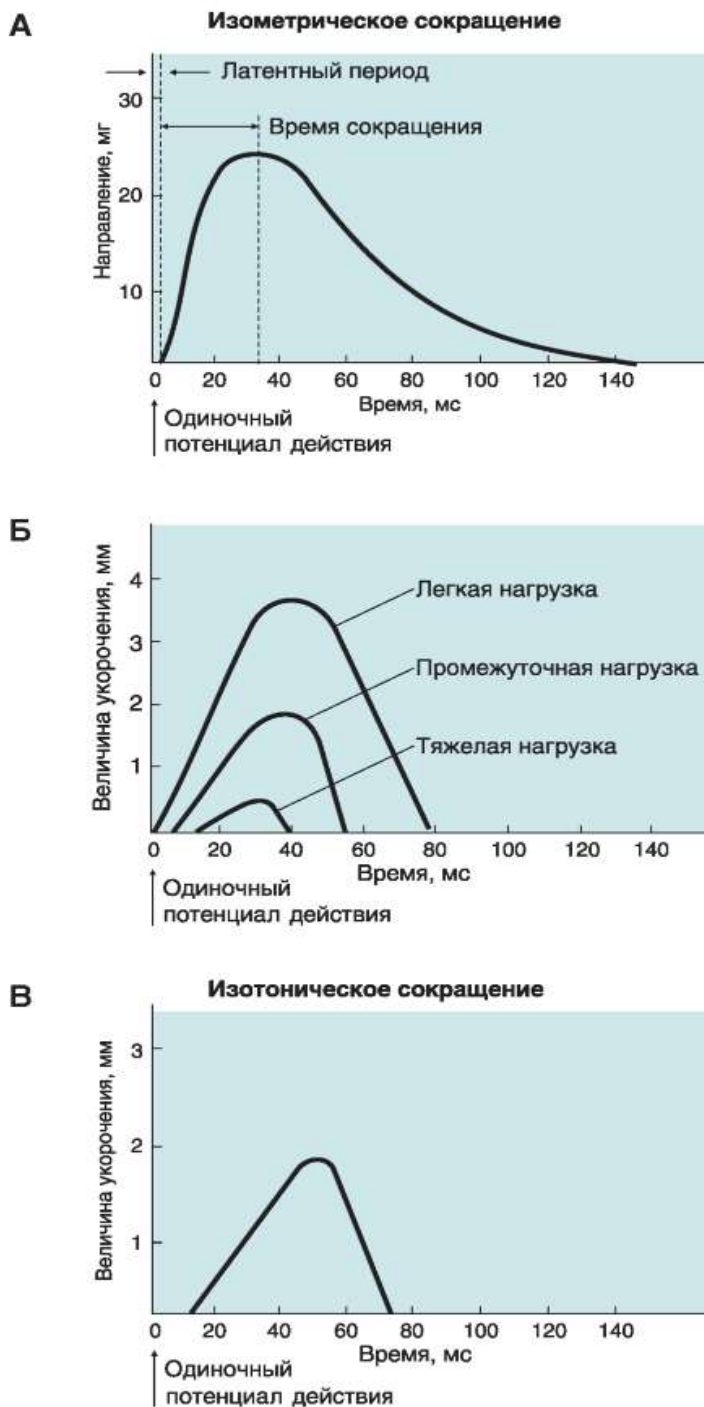
Рассмотрим подробнее последовательность явлений во время изотонического одиночного сокращения. При возбуждении мышечного волокна поперечные мостики начинают развивать силу, однако укорочение не начнется, пока мышечное напряжение не превысит нагрузку на волокно. Таким образом, укорочению предшествует период изометрического сокращения, в течение которого возрастает напряжение. Чем тяжелее нагрузка, тем больше потребуется времени, чтобы напряжение сравнялось с величиной нагрузки и началось укорочение. Если нагрузку повышать, то, в конце концов, мышечное волокно не сможет ее поднять, скорость и степень укорочения будут равны нулю и сокращение станет полностью изометрическим.

Заметим, что силу, с которой мышца при ее сокращении действует на предмет, называют мышечным напряжением (*tension*). Сила действия предмета (обычно его массы) на мышцу - это нагрузка (*load*). Кривая мышечного сокращения в отечественной литературе издревле называется «механограммой», т.е. записью механической активности мышцы. В мировой литературе обычно применяют понятия *resting tension (force)* для описания силы, с которой покоящаяся мышца действует на предмет (в mN), и *active tension (force)* для описания силы, с которой мышца при ее сокращении действует на предмет.

Силы мышечного напряжения и нагрузки противодействуют друг другу. Приведет ли сила, генерируемая мышечным волокном, к его укорочению, зависит от относительных величин напряжения и нагрузки. Чтобы мышечное волокно укоротилось и, таким образом, переместило нагрузку, его напряжение должно быть больше противодействующей нагрузки.

Рис. 4-11. Одиночное мышечное сокращение.

А - одиночное изометрическое сокращение волокна скелетной мышцы после одного потенциала действия. Б - одиночные изотонические сокращения при разных нагрузках. Величина, скорость и продолжительность укорочения уменьшаются с увеличением нагрузки, тогда как интервал времени от стимула до начала укорочения возрастает с увеличением нагрузки. В - одиночное изотоническое сокращение волокна скелетной мышцы после одного потенциала действия



Виды мышечных сокращений

Поскольку длительность одного потенциала действия в скелетном мышечном волокне составляет 1-2 мс, а одиночное сокращение может продолжаться 100 мс, момент инициации второго потенциала действия может попасть на период механической активности. На рисунке 4-12 А- В представлены изометрические сокращения мышечного волокна в ответ на три последовательных стимула. Изометрическое сокращение в ответ на первый стимул S_1 продолжалось 150 мс (рис. 4-12 А). Второй стимул S_2 , поданный через 200 мс после S_1 , когда мышечное волокно уже полностью расслабилось, вызвал второе сокращение, идентичное первому, а третий стимул S_3 с таким же интервалом - третье идентичное сокращение. На рисунке 4-12 Б интервал S_1 - S_2 остался равным 200 мс, а третий стимул был подан через 60 мс после S_2 , когда механический ответ на S_2 начал снижаться, но еще не закончился. Стимул S_3 вызвал сократительный ответ, максимальное

напряжение которого превысило ответ на S_2 . На рисунке 4-12 В интервал S_2 - S_3 был уменьшен до 10 мс, и максимальный механический ответ увеличился еще больше, причем ответ на S_3 оказался слитным продолжением ответа на S_2 .

Увеличение мышечного напряжения при последовательных потенциалах действия, возникающих до окончания фазы механической активности, называется суммацией. При слиянии одиночных сокращений во время ритмического раздражения наблюдается тетанус (тетаническое сокращение). При низких частотах раздражения механический ответ может быть волнообразным, так как волокно частично расслабляется в промежутках между стимулами; это зубчатый тетанус. Если частоту раздражения повысить, получается гладкий тетанус, без осцилляций (рис. 4-12 Г).

По мере повышения частоты потенциалов действия величина напряжения возрастает в результате суммации до тех пор, пока гладкий тетанус не достигнет максимума, после которого напряжение не будет увеличиваться при дальнейшем повышении частоты раздражения.

Чтобы объяснить причины суммации, нужно рассмотреть, какие процессы происходят в мышечных волокнах. Но сначала следует получить сведения об упругих свойствах мышцы. Мышца содержит пассивные упругие элементы (участки толстых и тонких филаментов, а также сухожилия), последовательно соединенные с сократительными элементами (генерирующими силу). Последовательные упругие элементы действуют как пружины, через которые активная сила, генерируемая поперечными мостиками, передается к нагрузке. Временной ход напряжения при изометрическом сокращении включает период, необходимый для растяжения последовательных упругих элементов.

Напряжение мышечного волокна в конкретный момент времени зависит от следующих факторов:

- 1) число поперечных мостиков, прикрепленных к актину и находящихся на 2-й стадии цикла поперечных мостиков в каждом саркомере;
- 2) сила, создаваемая каждым поперечным мостиком;
- 3) длительность активного состояния поперечных мостиков.

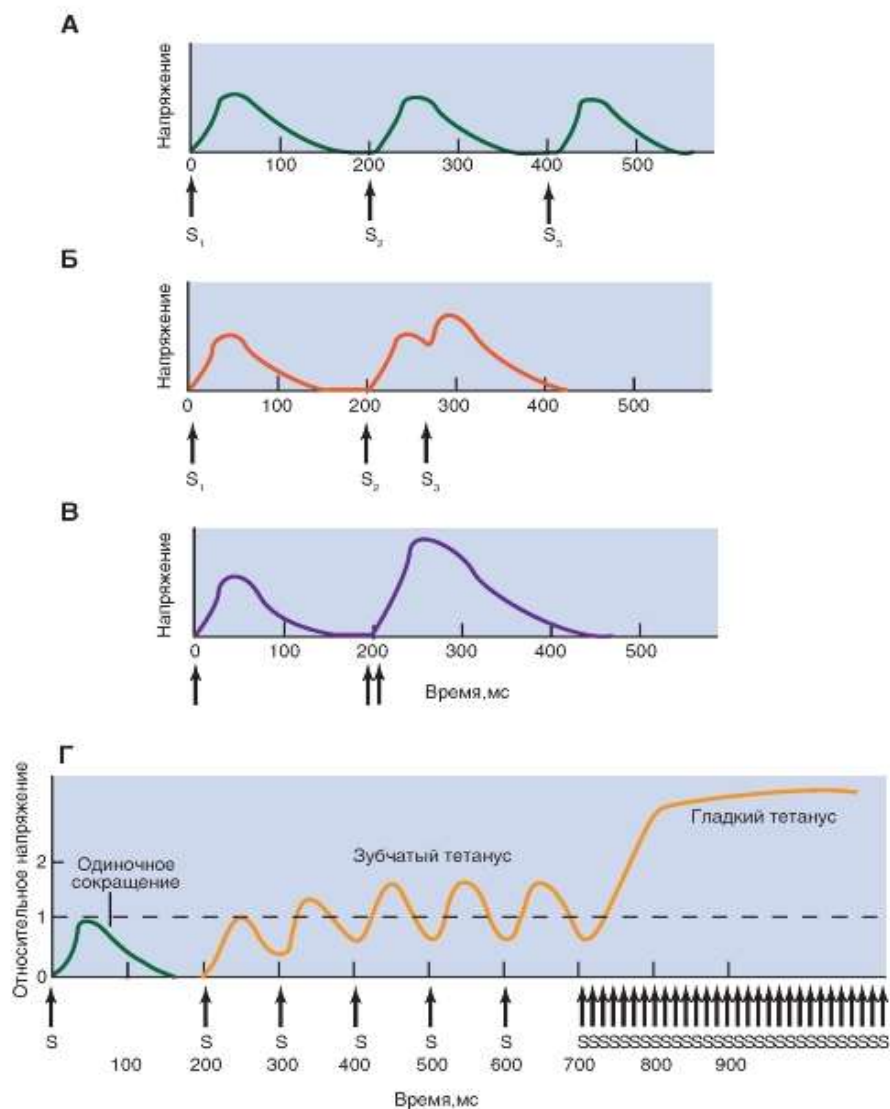
Один потенциал действия вызывает в мышечном волокне высвобождение такого количества Ca^{2+} , которое достаточно для насыщения тропонина, поэтому все участки связывания миозина на тонких филаментах изначально доступны. Однако связывание высокоэнергетической формы поперечных мостиков с этими участками (1-я стадия цикла поперечного мостика) занимает некоторое время, а кроме того, как было отмечено выше, необходимо время для растяжения последовательных упругих элементов. В результате, несмотря на изначальную доступность всех участков связывания при одиночном сокращении, максимальное напряжение развивается не сразу. Еще одно обстоятельство: почти сразу после высвобождения ионов Ca^{2+} начинается их обратный перенос в саркоплазматический ретикулум, так что концентрация Ca^{2+} в цитоплазме постепенно снижается относительно прежнего высокого уровня и, следовательно, на актиновых нитях остается все меньше участков связывания миозина, способных взаимодействовать с поперечными мостиками.

Иная ситуация во время тетанического сокращения. Каждый очередной потенциал действия вызывает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума раньше, чем заканчивается обратный перенос всех ионов Ca^{2+} , находящихся в цитоплазме после предыдущего потенциала действия. Благодаря этому устойчиво поддерживается повышенная цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} и, значит, не уменьшается количество доступных для связывания с миозином участков на актиновых филаментах. В итоге количество доступных для связывания участков остается на максимальном уровне, циклическая активность поперечных мостиков обеспечивает достаточное растяжение

последовательных упругих элементов и передачу максимального напряжения к концам мышечного волокна.

Рис. 4-12. Соотношение между частотой и напряжением.

А-В - суммация сокращений в результате уменьшения промежутков времени между стимулами S_2 и S_3 . Г - изометрические сокращения, вызванные серией стимулов с частотой 10/с (зубчатый тетанус) и 100/с (слитный тетанус); для сравнения показано одиночное сокращение



Соотношение между нагрузкой и скоростью укорочения

Скорость укорочения мышечного волокна уменьшается при увеличении нагрузки (рис. 4-13 А). Скорость укорочения максимальна при отсутствии нагрузки и равна нулю, когда нагрузка соответствует силе максимального изометрического напряжения. Если нагрузка станет больше, чем максимальное изометрическое напряжение, будет происходить удлинение мышечного волокна со скоростью, возрастающей с увеличением нагрузки; при очень большой нагрузке волокно разорвется.

Скорость укорочения определяется частотой повторения рабочих циклов каждого поперечного мостика и в конечном итоге частотой расщепления молекул АТФ, поскольку в каждом цикле поперечного мостика расщепляется одна молекула АТФ. Если нагрузка на

поперечный мостик увеличивается, молекулы АТФ подвергаются гидролизу реже (по ряду причин) и, следовательно, снижается скорость укорочения.

Соотношение между длиной мышцы и ее напряжением

Пассивные упругие свойства расслабленной мышцы обусловлены, главным образом, особенностями организации белка титина, молекула которого одним концом прикреплена к Z-поло- се, другим - к толстому филаменту, и действует подобно пружине. По мере растяжения мышцы пассивное напряжение расслабленного волокна возрастает, но не за счет активных движений поперечных мостиков, а благодаря растягиванию титиновых нитей. Если растянутое волокно отпустить, его длина вернется к равновесному состоянию, также как сокращается в аналогичной ситуации полоска резины. Растяжение приводит не только к пассивному напряжению мышечного волокна, но и к изменению его активного напряжения при сокращении. Поэтому сила, генерируемая во время сокращения, зависит от исходной длины мышечного волокна. Это проиллюстрировано экспериментом, когда мышечное волокно растягивают, и при каждой длине регистрируют величину активного напряжения в ответ на стимулы (рис. 4-13 Б). Длина, при которой волокно генерирует наибольшее активное изометрическое напряжение, называется оптимальной длиной,

При длине мышечного волокна, равной 60% от L_0 , волокно не генерирует напряжения в ответ на стимул. По мере растяжения волокна от этого исходного уровня активное изометрическое напряжение возрастает при каждом значении длины вплоть до максимума при длине L_0 . В ходе дальнейшего удлинения волокна его напряжение падает. При длине, составляющей 175% и более от L_0 , волокно не реагирует на раздражение.

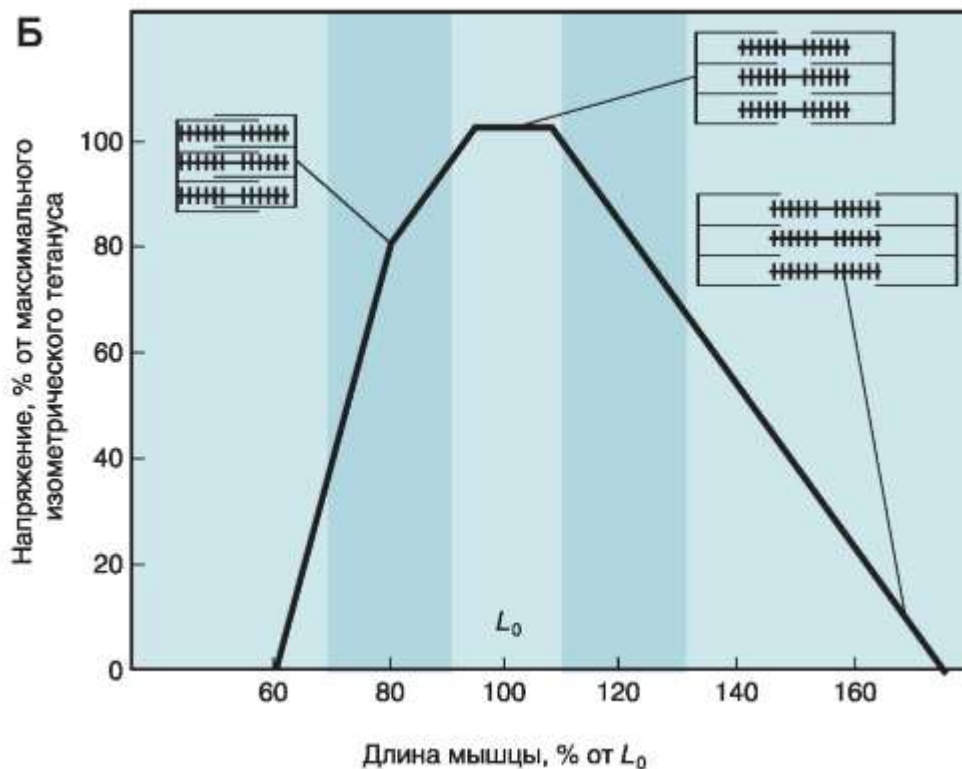
Когда скелетные мышцы расслаблены, длина большинства их волокон приближается к L_0 и, следовательно, оптимальна для генерирования силы. Длина расслабленных волокон меняется под действием нагрузки или в результате растягивания, обусловленного сокращением других мышц, однако пассивное изменение длины расслабленных волокон ограничено, поскольку мышцы прикреплены к костям. Пассивное изменение длины редко превышает 30%, а часто бывает гораздо меньше. В этом диапазоне значений исходной длины активное напряжение мышцы никогда не становится ниже половины напряжения, развиваемого при L_0 (рис. 4-13 Б).

Соотношение между исходной длиной волокна и его способностью развивать активное напряжение во время сокращения можно объяснить с позиций модели скользящих нитей. При растяжении расслабленного мышечного волокна происходит вытягивание тонких филаментов из пучков толстых филаментов, так что зона перекрывания уменьшается. Если волокно растянуто до $1,75 L_0$, филаменты уже не перекрываются. Поперечные мостики не могут связываться с актином, и напряжение не развивается. При меньшем растяжении (постепенное изменение длины от $1,75 L_0$ до L_0) зона перекрывания филаментов увеличивается, и напряжение, развиваемое при стимуляции, возрастает прямо пропорционально увеличению количества поперечных мостиков в зоне перекрывания. Самая большая зона перекрывания бывает при длине L_0 ; тогда к тонким филаментам может прикрепляться наибольшее количество поперечных мостиков, и генерируемое напряжение максимально.

Если длина волокна меньше L_0 , развиваемое напряжение снижается ввиду ряда обстоятельств. Во-первых, пучки тонких филаментов с противоположных концов саркомера начинают взаимно перекрываться, мешая прикреплению поперечных мостиков и развитию силы. Во-вторых, по неясным пока причинам при уменьшении длины волокна снижается сродство тропонина к Ca^{2+} и, следовательно, на тонких филаментах уменьшается количество участков, доступных для связывания с поперечными мостиками.

Рис. 4-13. Два основных соотношения: нагрузка - скорость укорочения мышцы, длина - напряжение мышцы.

А - скорость укорочения и удлинения волокна скелетной мышцы в зависимости от нагрузки. Отметим, что сила, действующая на поперечные мостики во время удлиняющего сокращения больше, чем максимальное изометрическое напряжение. Б - изменения активного изометрического тетанического напряжения в зависимости от длины мышечного волокна. Голубая область соответствует физиологическому диапазону значений длины волокон в мышце, прикрепленной к кости



Функциональная роль АТФ в процессе сокращения скелетной мышцы

1. В результате вызываемого миозином гидролиза АТФ поперечные мостики получают энергию для развития тянущего усилия.

2. Связывание АТФ с миозином сопровождается отсоединением поперечных мостиков, прикрепленных к актину.

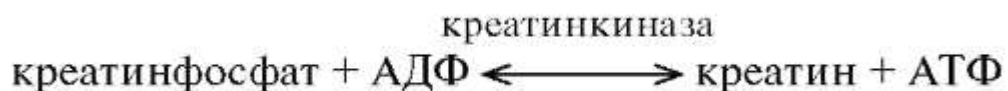
3. Гидролиз АТФ под действием Са-АТФазы саркоплазматического ретикулума поставляет энергию для активного транспорта Ca^{2+} в латеральные мешки саркоплазматического ретикулума, что приводит к снижению цитоплазматического Ca^{2+} до исходного уровня. Соответственно сокращение завершается, и мышечное волокно расслабляется.

В скелетных мышцах при их переходе от состояния покоя к сократительной активности - в 20 раз (или даже в несколько сотен раз) резко одномоментно повышается скорость расщепления АТФ. Небольшой запас АТФ в скелетной мышце достаточен лишь для нескольких одиночных сокращений. Чтобы поддерживать длительное сокращение, молекулы АТФ должны образовываться в процессе метаболизма с такой же скоростью, с какой они расщепляются во время сокращения.

Существуют три способа образования АТФ во время сокращения мышечного волокна (рис. 4-14):

- 1) фосфорилирование АДФ путем переноса фосфатной группы от креатинфосфата;
- 2) окислительное фосфорилирование АДФ в мито - хондриях;
- 3) фосфорилирование АДФ в процессе гликолиза в цитоплазме.

Благодаря фосфорилированию АДФ креатинфосфатом обеспечивается очень быстрое образование АТФ в самом начале сокращения:



В течение периода покоя концентрация креатинфосфата в мышечном волокне возрастает до уровня, примерно в пять раз превышающего содержание АТФ. В начале сокращения, когда начинаются снижение концентрации АТФ и увеличение концентрации АДФ вследствие расщепления АТФ под действием АТФазы миозина, реакция сдвигается в сторону образования АТФ за счет креатинфосфата. При этом переход энергии совершается с такой большой скоростью, что в начале сокращения концентрация АТФ в мышечном волокне изменяется мало, в то время как концентрация креатинфосфата падает быстро.

Хотя АТФ образуется за счет креатинфосфата очень быстро, посредством единственной ферментативной реакции, количество АТФ лимитировано исходной концентрацией креатинфосфата в клетке. Чтобы мышечное сокращение могло продолжаться дольше нескольких секунд, необходимо участие двух других, упоминавшихся выше, источников образования АТФ. После начала сокращения, обеспечиваемого за счет использования креатинфосфата, подключаются более медленные, требующие участия многих ферментов пути окислительного фосфорилирования и гликолиза, благодаря которым скорость образования АТФ увеличивается до уровня, соответствующего скорости расщепления АТФ.

При умеренной мышечной активности АТФ образуется преимущественно путем окислительного фосфорилирования, и в течение первых 5-10 мин главным ресурсом для этого служит гликоген. В последующие ~30 мин доминирующими становятся источники

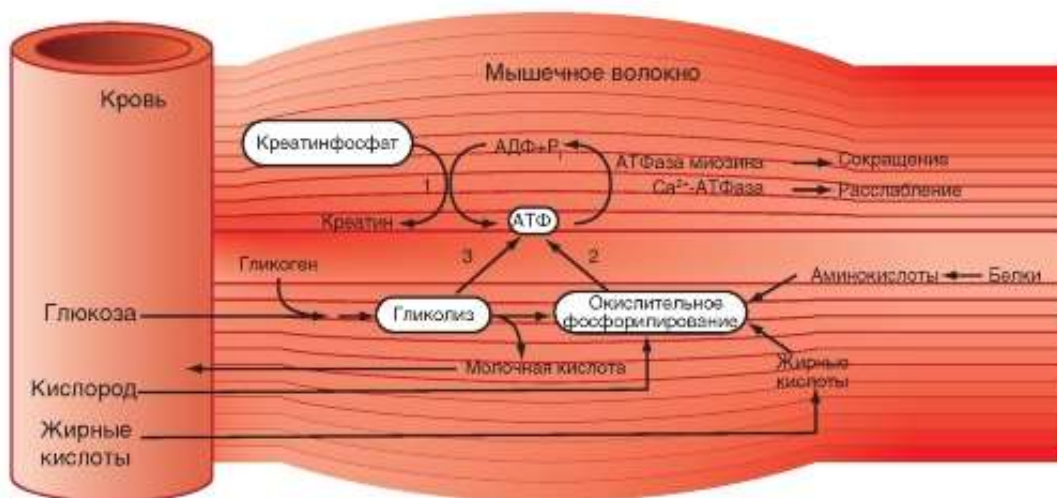
энергии, доставляемые кровью, причем глюкоза и жирные кислоты участвуют примерно в одинаковой мере. На более поздних этапах сокращения преобладает утилизация жирных кислот, а глюкоза расходуется меньше.

Если интенсивность мышечной работы такова, что скорость расщепления АТФ превышает 70% от ее максимального уровня, существенно возрастает вклад гликолиза в образование АТФ. Глюкоза для этого процесса поступает из двух источников: из крови или за счет запасов гликогена в мышечных волокнах. По мере усиления мышечной активности увеличивается доля АТФ, обеспечиваемая путем анаэробного процесса - гликолиза; соответственно образуется больше молочной кислоты.

По окончании мышечной работы запасы богатых энергией соединений (креатинфосфата и гликогена) в мышце снижены. Для восстановления запасов обоих соединений нужна энергия, поэтому мышца, уже находясь в состоянии покоя, продолжает некоторое время усиленно потреблять кислород. Благодаря усиленному потреблению кислорода в период после мышечной работы покрывается так называемый кислородный долг; и интенсивное образование АТФ путем окислительного фосфорилирования направлено на восстановление энергетических ресурсов в виде креатинфосфата и гликогена.

Рис. 4-14. Энергетический метаболизм скелетной мышцы.

Три ресурса для образования АТФ во время мышечного сокращения: 1 - креатинфосфат; 2 - окислительное фосфорилирование; 3 - гликолиз



Типы волокон скелетных мышц

Волокна скелетных мышц неодинаковы по своим механическим и метаболическим особенностям. Типы волокон различаются на основе следующих характеристик:

1) в зависимости от максимальной скорости укорочения - волокна быстрые и медленные;

2) в зависимости от главного пути образования АТФ - волокна оксидативные и гликолитические.

Быстрые и медленные мышечные волокна содержат изоферменты миозина, расщепляющие АТФ с разной максимальной скоростью, чему соответствует различная максимальная скорость рабочего цикла поперечных мостиков и, следовательно, разная

максимальная скорость укорочения волокна. Высокая АТФазная активность миозина свойственна быстрым волокнам, более низкая АТФазная активность - медленным волокнам. Хотя в быстрых волокнах скорость рабочего цикла примерно в 4 раза выше, чем в медленных, поперечные мостики обоих типов генерируют одинаковую силу.

Другой подход к классификации волокон скелетных мышц основан на различиях ферментативных механизмов синтеза АТФ. В некоторых волокнах много митохондрий и, следовательно, обеспечивается высокий уровень окислительного фосфорилирования; это оксидативные волокна. Количество образующейся в них АТФ зависит от снабжения мышцы кровью, с которой поступают молекулы кислорода, и богатых энергией соединений. Волокна этого типа окружены многочисленными капиллярами. Кроме того, в них присутствует связывающий кислород белок - миоглобин, который увеличивает скорость диффузии кислорода, а также выполняет функцию кратковременного кислородного депо в мышечной ткани. Благодаря значительному содержанию миоглобина оксидативные волокна окрашены в темно-красный цвет; их часто называют красными мышечными волокнами.

В гликолитических волокнах, наоборот, мало митохондрий, но высокое содержание ферментов гликолиза и большие запасы гликогена. Эти волокна окружены относительно небольшим числом капилляров, и миоглобина в их ткани немного, что соответствует ограниченному использованию кислорода. Вследствие недостатка миоглобина гликолитические волокна выглядят светлыми и получили название белых мышечных волокон.

На основании двух рассмотренных характеристик (скорость укорочения и тип метаболизма) можно выделить три типа волокон скелетных мышц.

1. Медленные оксидативные волокна (тип I) - низкая активность миозиновой АТФазы и высокая окислительная способность (рис. 4-15 А).

2. Быстрые оксидативные волокна (тип IIa) - высокая активность миозиновой АТФазы и высокая окислительная способность (рис. 4-15 Б).

3. Быстрые гликолитические волокна (тип IIб) - высокая активность миозиновой АТФазы и высокая гликолитическая способность (рис. 4-15 В).

Отметим, что не обнаружен четвертый теоретически возможный вариант - медленные гликолитические волокна.

Волокна варьируют не только по своим биохимическим особенностям, но и по размерам: у гликолитических волокон диаметр существенно больше, чем у оксидативных. Это сказывается на величине развиваемого ими напряжения. Что касается числа толстых и тонких филаментов на единицу площади поперечного сечения, то оно примерно одинаково для всех типов скелетных мышечных волокон. Таким образом, чем больше диаметр волокна, тем большее число параллельно задействованных толстых и тонких филаментов участвует в генерировании силы, и тем больше максимальное напряжение мышечного волокна. Отсюда следует, что гликолитическое волокно, которое имеет больший диаметр, развивает в среднем более значительное напряжение, по сравнению с напряжением оксидативного волокна.

Кроме того, рассмотренные три типа мышечных волокон характеризуются разной устойчивостью к утомлению. Быстрые гликолитические волокна утомляются через короткое время, тогда как медленные оксидативные волокна очень выносливы, что позволяет им длительно поддерживать сократительную активность практически при постоянном уровне напряжения. Быстрые оксидативные волокна занимают промежуточное место по способности противостоять развитию утомления.

Характеристики трех типов волокон скелетных мышц обобщены в табл. 4-1.

Рис. 4-15. Типы волокон скелетных мышц. Скорость развития утомления в волокнах трех типов.

Каждая вертикальная линия соответствует сократительному ответу на короткое тетаническое раздражение. Сократительные ответы в период между 9-й и 60-й мин пропущены

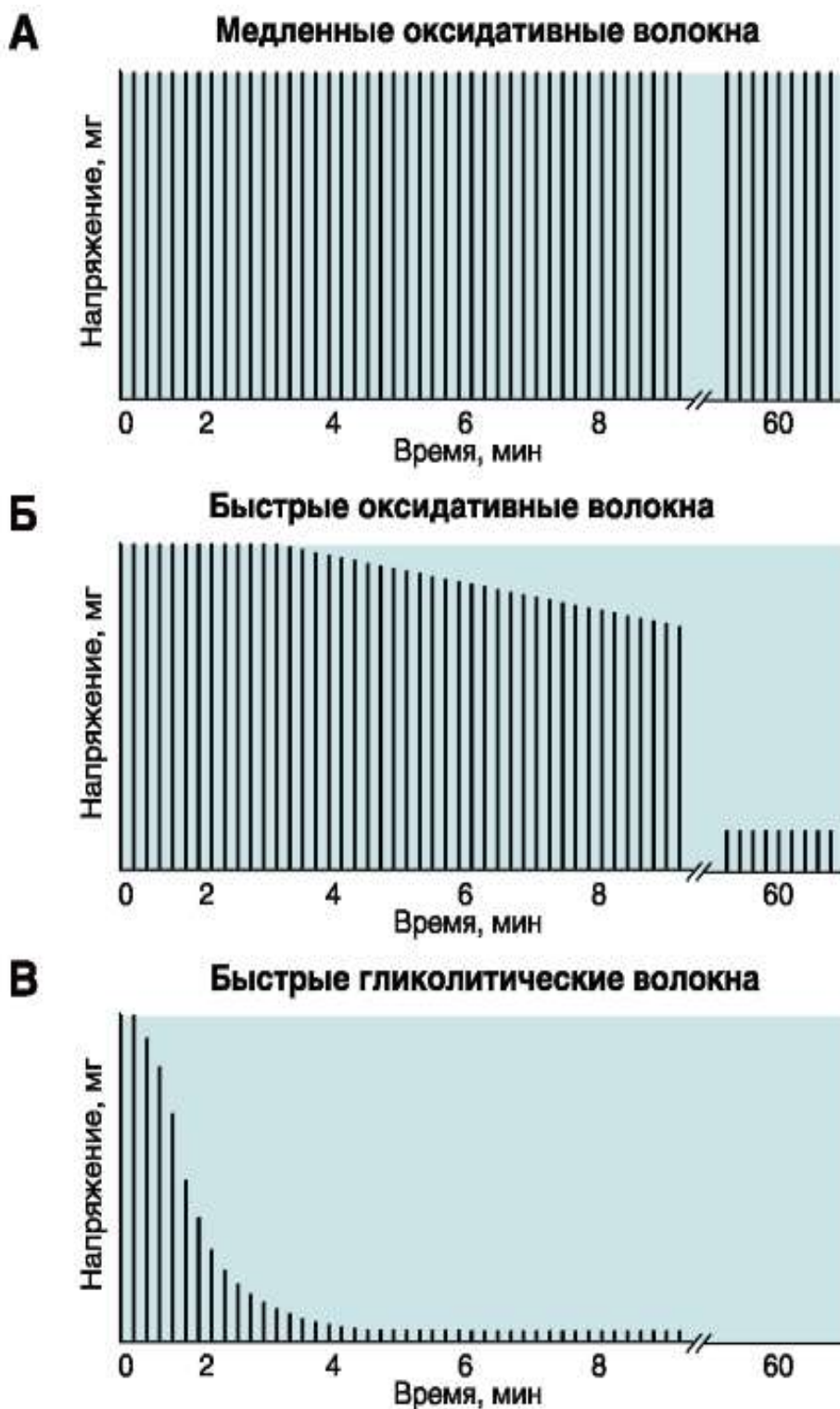


Таблица 4-1. Характеристики трех типов волокон скелетных мышц

Показатель	Медленные оксидативные волокна	Быстрые оксидативные волокна	Быстрые гликолитические волокна
Главный источник образования АТФ	Окислительное фосфорилирование	Окислительное фосфорилирование	Гликолиз
Митохондрии	Много	Много	Мало
Капилляры	Много	Много	Мало
Содержание миоглобина	Высокое (красные мышцы)	Высокое (красные мышцы)	Низкое (белые мышцы)
Активность ферментов гликолиза	Низкая	Промежуточная	Высокая
Содержание гликогена	Низкое	Промежуточное	Высокое
Скорость утомления	Медленная	Промежуточная	Быстрая
Активность АТФазы миокина	Низкая	Высокая	Высокая
Скорость укорочения	Медленная	Быстрая	Быстрая
Диаметр волокна	Малый	Промежуточный	Большой
Размер двигательной единицы	Малая	Промежуточная	Большая
Диаметр двигательного аксона	Малый	Промежуточный	Большой

Напряжение мышцы

Силу, с которой мышца при ее сокращении действует на предмет, называют мышечным напряжением (*tension*); сила действия предмета (обычно его масса) на мышцу - это нагрузка (*load*). Если мышце задать фоновую нагрузку, как обычно осуществляют при измерениях, то эту фоновую нагрузку называют *preload* - преднагрузкой или преа растяжением. Часто это пишут в русскоязычном написании - «прелод». Силы мышечного напряжения и нагрузки противодействуют друг другу. Приведет ли сила, генерируемая мышечным волокном, к его укорочению, зависит от относительных величин напряжения и нагрузки. Чтобы мышечное волокно укоротилось и таким образом переместило нагрузку, его напряжение должно быть больше противодействующей нагрузки.

Если мышца развивает напряжение, но не укорачивается (и не удлиняется), сокращение называют изометрическим (длина мышцы постоянна) (рис. 4-16 А). Такое сокращение происходит, когда мышца удерживает нагрузку в постоянном положении либо развивает силу по отношению к нагрузке, масса которой больше, чем мышечное напряжение. Если мышца укорачивается, а нагрузка на нее остается постоянной, сокращение называют изотоническим (напряжение мышцы постоянно) (рис. 4-16 Б).

Третий тип сокращения - удлиняющее сокращение (эксцентрическое сокращение), когда действующая на мышцу нагрузка больше, чем напряжение, развиваемое поперечными мостиками. В такой ситуации нагрузка растягивает мышцу, несмотря на противодействующую силу, создаваемую движениями поперечных мостиков. Эксцентрическое сокращение происходит, если поддерживаемый мышцей объект смещается вниз (примеры: человек садится из положения стоя или спускается вниз по лестнице). Следует подчеркнуть, что в подобных условиях удлинение мышечных волокон не активный процесс, осуществляемый сократительными белками, а результат действия на мышцу внешней силы. При отсутствии внешней силы, удлиняющей мышцу, волокно при его стимуляции будет только укорачиваться, но не удлиняться. Все три типа сокращения (изометрическое, изотоническое и эксцентрическое) - это естественные события повседневной деятельности.

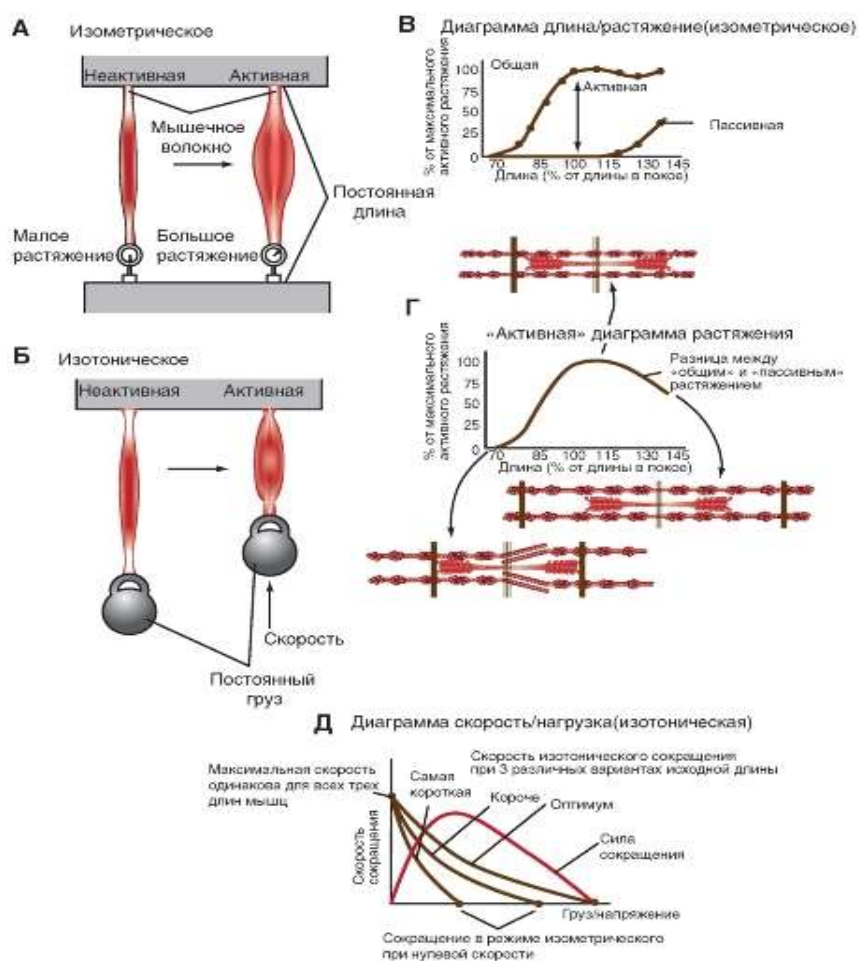
При каждом типе сокращения поперечные мостики ритмически повторяют цикл, состоящий из четырех стадий. На 2-й стадии изотонического сокращения поперечные мостики, связанные с актином, совершают вращательное движение, заставляя саркомы укорачиваться. По-другому происходит при изометрическом сокращении: из-за нагрузки, действующей на мышцу, связанные с актином поперечные мостики не могут сдвинуть тонкие филаменты, но передают им силу - изометрическое напряжение. Во время 2-й

стадии эксцентрического сокращения поперечные мостики испытывают действие нагрузки, которая тянет их назад к Z-пластинке, при этом они остаются прикрепленными к актину и развивают усилие. Стадии 1, 3 и 4 проходят одинаково при всех трех типах сокращений. Таким образом, при каждом типе сокращения сократительные белки претерпевают одинаковые химические изменения. Конечный результат (укорочение, отсутствие изменений длины или удлинение) определяется величиной нагрузки на мышцу.

На рисунке 4-16 В показана зависимость «длина-tension» при изометрическом сокращении, а на рис. 4-16 Г только «активный» фрагмент этой зависимости, т.е. разница между «пассивной» кривой и общей кривой. Далее показаны (рис. 4-16 Д) характерные кривые, отражающие зависимость «нагрузка-скорость».

Рис. 4-16. Изометрическое и изотоническое сокращение.

А - экспериментальный препарат для изучения мышечных сокращений в изометрических условиях. Б - экспериментальный препарат для изучения мышечных сокращений в изотонических условиях. В - пассивная кривая, демонстрирующая мышечное напряжение (*tension*), которое измеряется при различных длинах мышцы перед сокращением. Суммарная кривая, демонстрирующая мышечное напряжение (*tension*), которая измеряется при различных длинах мышцы в течение сокращения. Г - активное мышечное напряжение (*active tension*) представляет собой разницу между суммарным и пассивным мышечным напряжением на панели (С). Д - три кривые голубого цвета показывают, что скорость укорочения мышцы быстрее, если мышца натянута массой



Опорно-двигательный аппарат

Сокращающаяся мышца передает усилие костям через сухожилия. Если усилие достаточно, то при укорочении мышцы кости перемещаются. При сокращении мышца развивает только тянущее усилие, так что кости, к которым она прикреплена, по мере ее укорочения подтягиваются друг к другу. При этом может происходить сгибание конечности в суставе (флексия) или разгибание (экстензия) - выпрямление конечности (рис. 4-17 А). В этих противоположно направленных движениях должны участвовать, по крайней мере, две разные мышцы - сгибатель и разгибатель. Мышечные группы, осуществляющие движения сустава в противоположных направлениях, называют антагонистами. Как показано на рис. 4-17 А, при сокращении двуглавой мышцы плеча (*m. biceps*) рука сгибается в локтевом суставе, тогда как сокращение мышцы-антагониста - трехглавой мышцы плеча (*m. triceps*) заставляет руку разгибаться. Обе мышцы создают при сокращении только тянущее усилие по отношению к предплечью.

Группы мышц-антагонистов необходимы не только для сгибания и разгибания, но и для движения конечностей в стороны или для вращения. Некоторые мышцы при сокращении могут создавать два типа движения в зависимости от сократительной активности других мышц, действующих на ту же конечность. Например, при сокращении икроножной мышцы (*m. gastrocnemius*) нога сгибается в колене, например, во время ходьбы (рис. 4-17 Б). Однако, если икроножная мышца сокращается одновременно с четырехглавой мышцей бедра (*m. quadriceps femoris*), которая выпрямляет ногу в голени, коленный сустав не может согнуться, так что движение возможно только в голеностопном суставе. Происходит разгибание стопы, т.е. человек приподнимается на кончиках пальцев ног - «встает на цыпочки».

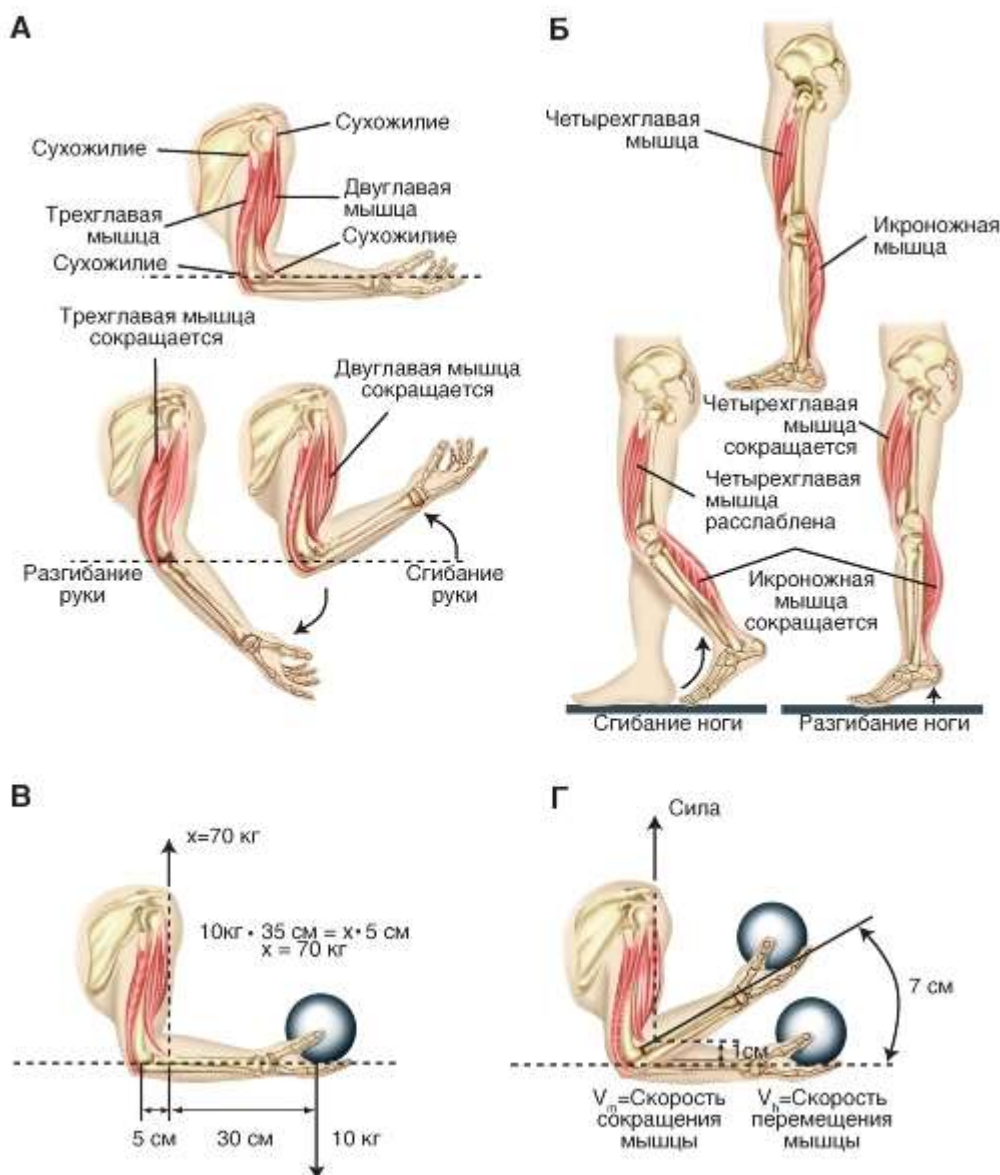
Мышцы, кости и суставы тела представляют собой системы рычагов. Принцип действия рычага можно проиллюстрировать на примере сгибания предплечья (рис. 4-17 В): двуглавая мышца оказывает тянущее усилие, направленное вверх, на участок предплечья примерно на расстоянии 5 см от локтевого сустава. В рассматриваемом примере кисть руки удерживает нагрузку 10 кг, т.е. на расстоянии примерно 35 см от локтя действует направленная вниз сила величиной 10 кг. Согласно законам физики, предплечье находится в состоянии механического равновесия (т.е. суммарная сила, действующая на систему, равна нулю), когда произведение направленной вниз силы (10 кг) на расстояние от места ее приложения до локтя (35 см) равно произведению изометрического напряжения мышцы (X) на расстояние от нее до локтя (5 см). Итак, $10 \times 35 = 5 \times X$; отсюда $X = 70$ кг. Отметим, что работа этой системы механически невыгодна, поскольку сила, развиваемая мышцей, гораздо больше, чем масса удерживаемой нагрузки (10 кг).

Однако механически невыгодные условия работы большинства механизмов мышечных рычагов компенсируются за счет повышения маневренности. На рисунке 4-17 показано, что укорочению двуглавой мышцы на 1 см соответствует перемещение кисти на расстояние 7 см. Поскольку укорочение мышцы на 1 см и перемещение кисти на 7 см совершаются за одно и то же время, скорость движения кисти в семь раз больше, чем скорость укорочения мышцы. Система рычагов играет роль усилителя, благодаря которому небольшие относительно медленные движения двуглавой мышцы преобразуются в более быстрые движения кисти. Так мяч, брошенный подающим игроком баскетбольной команды, летит со скоростью 90-100 миль/ч (примерно 150-160 км/ч), хотя мышцы игрока укорачиваются во много раз медленнее.

Рис. 4-17. Мышцы и кости действуют как система рычагов.

А - мышцы-антагонисты, осуществляющие сгибание и разгибание предплечья. Б - сокращение икроножной мышцы приводит к сгибанию нижней конечности, когда

четырёхглавая мышца бедра расслаблена, или к разгибанию, когда последняя сокращается, не позволяя коленному суставу сгибаться. В - механическое равновесие сил, действующих на предплечье, когда рука держит груз 10 кг. Г - рычажная система руки действует как усилитель по отношению к скорости сокращения двуглавой мышцы плеча, увеличивая скорость перемещения кисти. Система является также усилителем диапазона перемещений кисти (при укорочении мышцы на 1 см кисть перемещается на 7 см)



Нервно-мышечное соединение

Сигналом для запуска сокращения служит потенциал действия плазматической мембраны волокна скелетной мышцы. В скелетных мышцах потенциалы действия можно вызвать только одним способом - раздражением нервных волокон.

Волокна скелетных мышц иннервируются аксонами нервных клеток, называемых мотонейронами (или соматическими эфферентными нейронами). Тела этих клеток расположены в стволе мозга или в спинном мозге. Аксоны мотонейронов покрыты миелиновой оболочкой, а их диаметр больше, чем у других аксонов, поэтому они

проводят потенциалы действия с высокой скоростью, обеспечивая поступление сигналов из ЦНС к волокнам скелетных мышц лишь с минимальной задержкой.

Войдя в мышцу, аксон мотонейрона разделяется на множество ветвей, каждая из которых образует одно соединение с мышечным волокном. Один мотонейрон иннервирует много мышечных волокон, но каждым мышечным волокном управляет ветвь только от одного мотонейрона. Мотонейрон вместе с мышечными волокнами, которые он иннервирует, составляет двигательную единицу. Мышечные волокна одной двигательной единицы находятся в одной и той же мышце, но не в виде компактной группы, а рассеяны по мышце. Когда в мотонейроне возникает потенциал действия, все мышечные волокна его двигательной единицы получают стимул к сокращению.

При подходе аксона к поверхности мышечного волокна миелиновая оболочка заканчивается, и аксон образует терминальную часть (нервное окончание) в виде нескольких коротких отростков, располагающихся в желобках на поверхности мышечного волокна. Область плазматической мембраны мышечного волокна, лежащая непосредственно под нервным окончанием, обладает особыми свойствами и называется двигательной концевой пластинкой. Структура, состоящая из нервного окончания и двигательной концевой пластинки, известна как нервно-мышечное соединение (нервно-мышечный синапс).

Терминали аксонов мотонейрона (двигательные нервные окончания) содержат везикулы, заполненные АЦХ. Поступающий от мотонейрона потенциал действия деполяризует плазматическую мембрану нервного окончания, вследствие чего открываются потенциалуправляемые Ca^{2+} -каналы, и в нервное окончание входит Ca^{2+} из внеклеточной среды. Ионы Ca^{2+} связываются с белками, обеспечивающими слияние мембраны везикул с плазматической мембраной нервного окончания, и происходит освобождение АЦХ в синаптическую щель, разделяющую нервное окончание и двигательную концевую пластинку. Молекулы АЦХ диффундируют от нервного окончания к двигательной концевой пластинке, где они связываются с ацетилхолиновыми рецепторами никотинового типа, при этом открываются ионные каналы, проницаемые как для Na^+ , так и для K^+ . Из-за разницы трансмембранных электрохимических градиентов этих ионов, входящий в мышечное волокно поток Na^+ больше, чем выходящий поток K^+ , благодаря чему возникает местная деполяризация двигательной концевой пластинки - потенциал концевой пластинки (ПКП). ПКП аналогичен ВПСР в межнейронных синапсах. Однако амплитуда одиночного ПКП существенно выше, чем амплитуда ВПСР, потому что в нервно-мышечном соединении высвобождаемый нейромедиатор попадает на более обширную поверхность, где он связывается с гораздо большим количеством рецепторов, и где, следовательно, открывается намного больше ионных каналов. По этой причине амплитуда одиночного ПКП обычно бывает более чем достаточной для того, чтобы в смежной с концевой пластинкой области плазматической мышечной мембраны возник местный электрический ток, инициирующий потенциал действия. Затем потенциал действия распространяется по поверхности мышечного волокна посредством такого же механизма, что и в мембране аксона. Большинство нервно-мышечных соединений расположено в срединной части мышечного волокна, откуда возникший потенциал действия распространяется к обоим концам волокна. В скелетной мышце человека никогда не возникают тормозные потенциалы. Все нервно-мышечные соединения - возбуждающие.

Наряду с рецепторами АЦХ на двигательной концевой пластинке присутствует фермент ацетилхолинэстераза (АЦХ-эстераза), которая расщепляет АЦХ. По мере того как концентрация свободного АЦХ снижается вследствие его расщепления АЦХ-эстеразой, уменьшается количество АЦХ, способного связываться с рецепторами. Когда не остается

рецепторов, связанных с АЦХ, ионные каналы концевой пластинки становятся закрытыми. Деполяризация концевой пластинки завершается, мембранный потенциал возвращается к уровню покоя, и концевая пластинка вновь способна отвечать на АЦХ, высвобождаемый при поступлении к нервному окончанию следующего потенциала действия.

Рис. 4-18. Возбуждение мембраны мышечного волокна: нервно-мышечное соединение

Последовательные явления от инициации потенциала действия мотонейрона до сокращения мышечного волокна
1. Потенциал действия, возникший в мотонейроне, распространяется по аксону.
2. Потенциал действия запускает высвобождение АЦХ из нервных окончаний в нервно-мышечные соединения.
3. АЦХ диффундирует от нервных окончаний к двигательной концевой пластинке мышечного волокна.
4. АЦХ связывается с рецепторами двигательной концевой пластинки, открывая ионные каналы для Na^+ и K^+ .
5. Входящий поток Na^+ , который больше выхода K^+ , деполяризует мембрану, вызывая потенциал концевой пластинки (ПКП).
6. Местные токи деполяризуют смежную область мышечной мембраны до порогового уровня, при котором генерируется потенциал действия, распространяющийся по поверхности мышечного волокна и по поперечным трубочкам вглубь него.
7. Потенциал действия, поступивший по мембране поперечных трубочек, запускает высвобождение Ca^{2+} из латеральных мешков саркоплазматического ретикулула.
8. Ионы Ca^{2+} связываются с тропонином актиновых филаментов. В результате этого тропомиозин смещается из своего блокирующего положения, открывая участки связывания актина с поперечными мостиками толстых филаментов.
9. Получившие энергию миозиновые поперечные мостики связываются с актином: $\text{A} + \text{M}^* \cdot \text{АДФ} \cdot \text{P}_i \rightarrow \text{A} \cdot \text{M}^* \cdot \text{АДФ} \cdot \text{P}_i$
10. Благодаря связыванию миозин освобождается из напряженной конформации; при этом каждый поперечный мостик совершает движение по дуге: $\text{A} \cdot \text{M}^* \cdot \text{АДФ} \cdot \text{P}_i \rightarrow \text{A} \cdot \text{M} + \text{АДФ} + \text{P}_i$
11. АТФ связывается с миозином, разрывая связь между актином и миозином, что позволяет поперечным мостикам отделиться от актина: $\text{A} \cdot \text{M} + \text{АТФ} \rightarrow \text{A} + \text{M} \cdot \text{АТФ}$
12. АТФ, связанная с миозином, расщепляется, снабжая энергией миозиновые поперечные мостики: $\text{M} \cdot \text{АТФ} \rightarrow \text{M}^* \cdot \text{АДФ} \cdot \text{P}_i$
13. Поперечные мостики повторяют этапы с 9-го по 12-й, обеспечивая скольжение тонких филаментов вдоль толстых. Циклические движения поперечных мостиков повторяются до тех пор, пока ионы Ca^{2+} остаются связанными с тропонином.
14. Цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} снижается в процессе активного транспорта ионов посредством Ca^{2+} -АТФазы в саркоплазматический ретикулум.
15. При удалении Ca^{2+} от тропонина тропомиозин возвращается в блокирующее положение; циклические движения поперечных мостиков останавливаются, мышечное волокно расслабляется.

Электромеханическое сопряжение

Ранние исследования изолированного сердца позволили обнаружить, что для сокращения сердечной мышцы необходимы оптимальные концентрации Na^+ , K^+ и Ca^{2+} . Без Na^+ сердце невозбудимо, оно не станет биться, так как потенциал действия зависит от внеклеточных ионов натрия. Напротив, потенциал покоящейся мембраны не зависит от

трансмембранного градиента ионов Na^+ . В нормальных условиях внеклеточная концентрация K^+ составляет около 4 мМ. Снижение концентрации внеклеточного K^+ не оказывает большого влияния на возбуждение и сокращение сердечной мышцы. Однако увеличение концентрации внеклеточного K^+ до достаточно высоких уровней вызывает деполяризацию, потерю возбудимости клеток миокарда и остановку сердца в диастоле. Ca^{2+} также существенно важен для сердечных сокращений. Удаление Ca^{2+} из внеклеточной жидкости приводит к уменьшению силы сердечных сокращений и последующей остановке сердца в диастоле. Напротив, увеличение концентрации внеклеточного Ca^{2+} усиливает сердечные сокращения, а очень высокие концентрации Ca^{2+} приводят к остановке сердца в систоле. Свободный внутриклеточный Ca^{2+} служит ионом, отвечающим за сократительную способность миокарда.

На двух панелях рисунка показаны механизмы электромеханического сопряжения в сердце, описанные ниже. Возбуждение сердечной мышцы начинается, когда волна возбуждения быстро распространяется вдоль сарколеммы клеток миокарда от клетки к клетке через щелевые контакты. Возбуждение также распространяется внутрь клеток через поперечные трубки, которые инвагинированы в сердечные волокна на Z-полосах. Электростимуляция в области Z-полосы или аппликация ионизированного Ca^{2+} в области Z-полосы сердечных волокон, освобожденных от оболочки (с удаленными сарколеммами), вызывает локальное сокращение соседних миофибрилл. Во время плато потенциала действия повышается проницаемость сарколеммы для Ca^{2+} . Ca^{2+} входит в клетку по его электрохимическому градиенту через кальциевые каналы сарколеммы и ее инвагинаций, т.е. через мембраны Т-системы.

Считается, что открытие кальциевых каналов происходит в результате фосфорилирования протеинов каналов с помощью циклической аденозинмонофосфатзависимой протеинкиназы (цАМФзависимой протеинкиназы). Первоначальным источником внеклеточного Ca^{2+} служит интерстициальная жидкость (10^{-3} М Ca^{2+}). Некоторое количество Ca^{2+} может также быть связано с сарколеммой и с гликокаликсом, мукополисахаридом, покрывающим сарколемму. Количество кальция, попадающего внутрь клетки из внеклеточного пространства, недостаточно для того, чтобы вызвать сокращение миофибрилл. Вошедший внутрь кальций («запускающий или триггерный» Ca^{2+}) запускает высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума (где есть запас внутриклеточного Ca^{2+}). Концентрация свободного Ca^{2+} в цитоплазме возрастает от уровня покоя (*resting level*) примерно в 10^{-7} М до уровней от 10^{-6} до 10^{-5} М во время возбуждения. Затем Ca^{2+} связывается с белком тропонином С. Кальциево-тропониновый комплекс взаимодействует с тропомиозином, чтобы снять блок с активных участков между актиновыми и миозиновыми филаментами. Это снятие блока позволяет образовываться циклическим поперечным связям между актином и миозином и, следовательно, позволяет миофибриллам сокращаться.

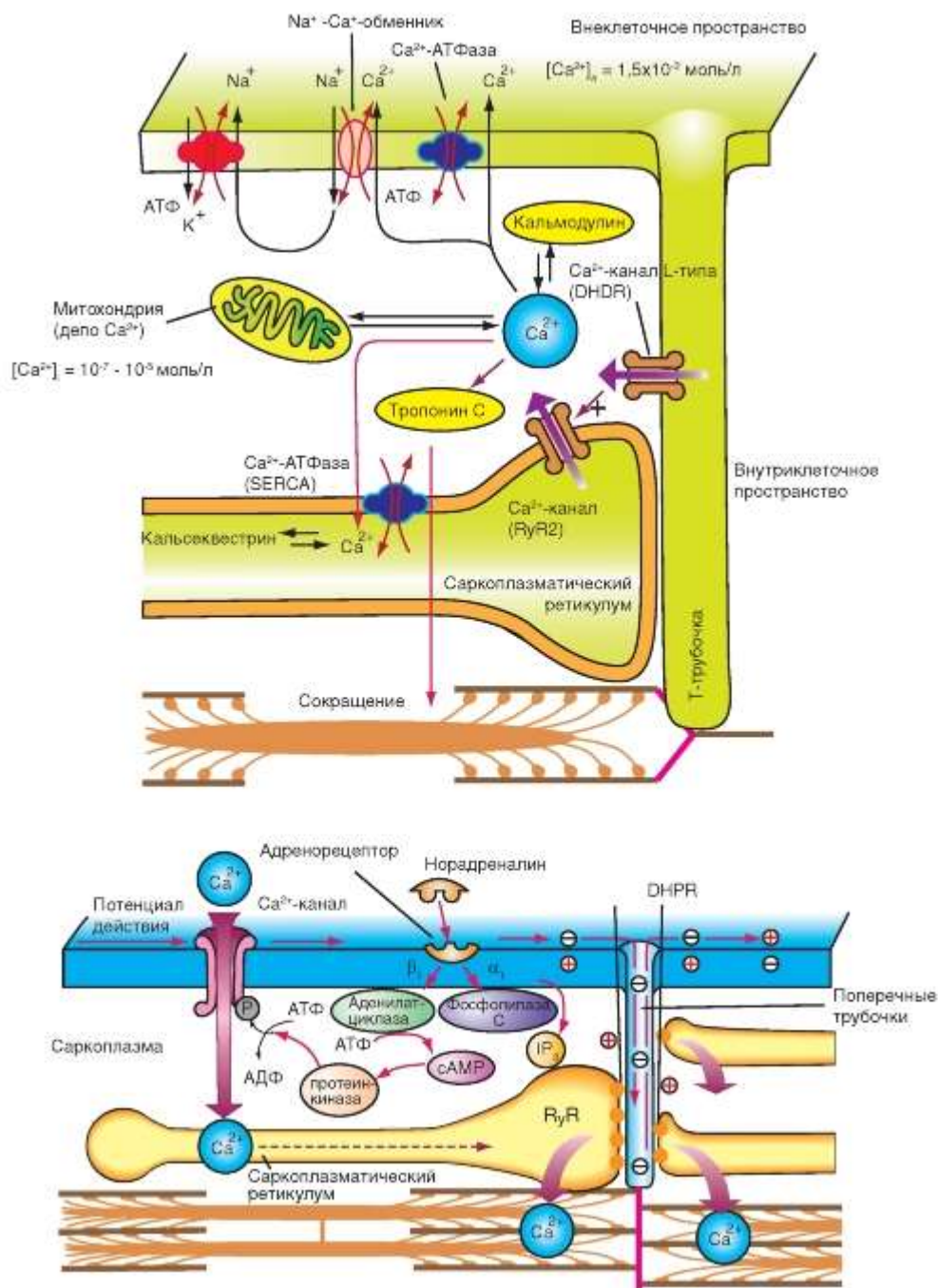
Механизмы, повышающие концентрацию Ca^{2+} в цитозоли, увеличивают развиваемую силу сердечных сокращений (*active force*), а механизмы, которые снижают концентрацию Ca^{2+} в цитозоли, уменьшают ее. Например, катехоламины увеличивают поступление Ca^{2+} в клетку путем фосфорилирования каналов через цАМФ-зависимую протеинкиназу. К тому же катехоламины, подобно другим агонистам, увеличивают силу сердечных сокращений путем повышения чувствительности сократительного механизма к Ca^{2+} . Повышение концентрации внеклеточного Ca^{2+} или уменьшение градиента Na^+ через сарколемму также приводит к увеличению концентрации Ca^{2+} в цитозоле.

Градиент натрия может быть понижен путем увеличения внутриклеточной концентрации Na^+ или путем понижения внеклеточной концентрации Na^+ . Сердечные гликозиды повышают внутриклеточную концентрацию Na^+ путем «отравления» Na^+/K^+ -АТФазы, что приводит к аккумуляции Na^+ в клетках. Повышение концентрации Na^+ в цитозоле изменяет направление $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменника (*$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger*) на

противоположное, так что из клетки удаляется меньше Ca^{2+} . Пониженная концентрация внеклеточного Na^+ служит причиной того, что меньше Na^+ входит в клетку, и, таким образом, меньше Na^+ заменяется на Ca^{2+} .

Достигнутое механическое напряжение (*tension*) уменьшается за счет снижения концентрации внеклеточного Ca^{2+} , увеличения трансмембранного градиента Na^+ или применения блокаторов Ca^{2+} -каналов, которые препятствуют входу Ca^{2+} в клетки миокарда.

Рис. 4-19. Электромеханическое сопряжение в сердце



Физиология гладких мышц

Гладкое мышечное волокно - это веретеновидная клетка диаметром от 2 до 10 мкм. В отличие от многоядерных волокон скелетных мышц, которые после завершения дифференцировки уже не могут делиться, гладкие мышечные волокна обладают

единственным ядром и способны к делению на протяжении всей жизни организма. Деление начинается в ответ на разнообразные паракринные сигналы, часто - на повреждение ткани.

Значительное разнообразие факторов, модифицирующих сократительную деятельность гладких мышц различных органов, затрудняет классификацию гладких мышечных волокон. Однако есть общий принцип, основанный на электрических характеристиках плазматической мембраны. В соответствии с этим принципом большинство гладких мышц можно отнести к одному из двух типов: унитарные гладкие мышцы (*single-unit smooth muscles*) с волокнами, связанными в единое целое (рис. 4-20 А), клетки которых взаимодействуют через *gap junction*, и мультиунитарные гладкие мышцы (*multiunit smooth muscles*) с индивидуальной иннервацией волокон (рис. 4-20 Б).

Унитарные гладкие мышцы

В мышцах этого типа активность (электрическая и механическая) осуществляется разными клетками синхронно, т.е. на стимулы мышца реагирует как единое целое. Это обусловлено тем, что мышечные волокна связаны друг с другом *gap junction* (щелевыми контактами), через которые потенциал действия может посредством локальных токов распространяться от одной клетки в соседние. Таким образом, электрическая активность, возникшая в любой клетке унитарных гладких мышц, передается ко всем волокнам (рис. 4-20 А). Некоторые волокна унитарных гладких мышц обладают пейсмекерными свойствами. В них спонтанно возникают потенциалы действия, которые проводятся через *gap junction* к волокнам, не обладающим такой активностью. Большинство клеток унитарных гладких мышц не являются пейсмекерными.

На сократительную активность унитарных гладких мышц оказывают влияние электрическая активность нервов, гормоны, локальные факторы; эти влияния опосредуются механизмами, рассмотренными выше применительно к деятельности всей гладкой мускулатуры. Характер иннервации унитарных гладких мышц существенно варьирует в разных органах. Во многих случаях нервные окончания сосредоточены в тех областях мышцы, где находятся пейсмекерные клетки. Активность всей мышцы может регулироваться посредством изменений частоты потенциалов действия пейсмекерных клеток.

Еще одна особенность унитарных гладких мышц состоит в том, что часто ее волокна сокращаются в ответ на растяжение. Сокращения возникают при растяжении стенок многих полых органов (например, матки), когда возрастает объем их внутреннего содержимого.

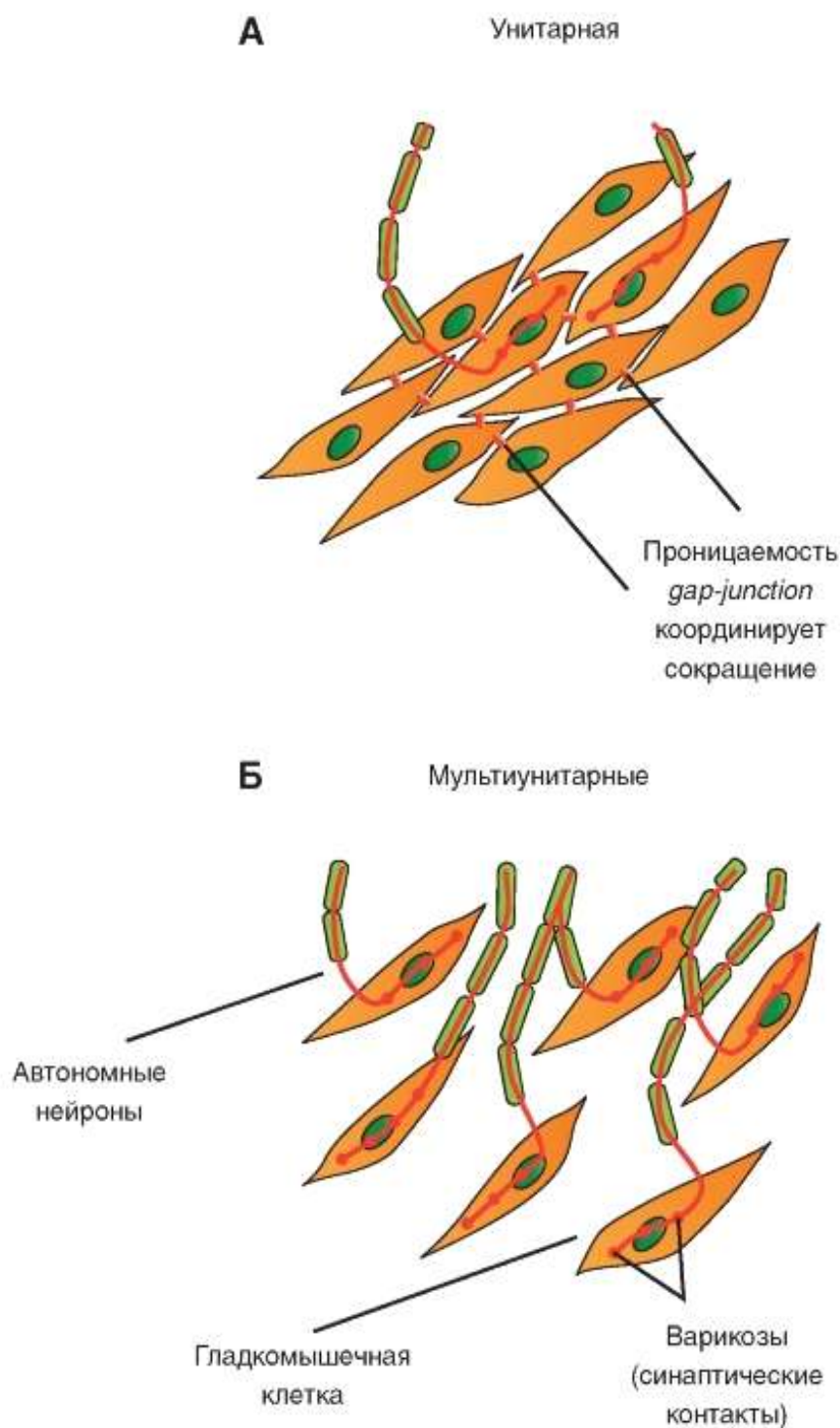
Примеры унитарных гладких мышц: мышцы стенок желудочно-кишечного тракта, матки, тонких кровеносных сосудов.

Мультиунитарные гладкие мышцы

Между клетками мультиунитарных гладких мышц мало *gap junction*, каждое волокно действует независимо от соседних, и мышца ведет себя как множество самостоятельных элементов. Мультиунитарные гладкие мышцы обильно снабжены ветвлениями вегетативных нервов (рис. 4-20 Б). Общий ответ всей мышцы зависит от количества активированных волокон и от частоты нервных импульсов. Хотя поступающие нервные импульсы сопровождаются деполяризацией и сократительными ответами волокон, потенциалы действия в мультиунитарных гладких мышцах, как правило, не генерируются. Сократительная активность мультиунитарных гладких мышц усиливается либо ослабевает в результате поступления с кровью гормонов, однако мультиунитарные гладкие мышцы не сокращаются при растяжении. Примеры мультиунитарных гладких мышц: мышцы в стенках бронхов и крупных артерий и др.

Следует подчеркнуть, что большинство гладких мышц не обладают свойствами исключительно унитарных либо мультиунитарных гладких мышц. В действительности существует непрерывное множество вариаций гладких мышц с разными сочетаниями свойств того и другого типа; унитарные гладкие мышцы и мультиунитарные гладкие мышцы - это две крайности.

Рис. 4-20. Структура гладких мышц



Потенциалы гладких мышц

Некоторые типы гладких мышечных волокон генерируют потенциалы действия спонтанно, при отсутствии всякого нейрогенного или гормонального воздействия. Потенциал покоя плазматической мембраны таких волокон не поддерживается на постоянном уровне, а подвергается постепенной деполяризации до тех пор, пока он не достигнет порогового уровня и не произойдет генерирование потенциала действия. После реполяризации мембраны вновь начинается ее деполяризация (рис. 4-21), так что возникает серия потенциалов действия, вызывающая тоническую сократительную активность. Спонтанные сдвиги потенциала, деполяризующие мембрану до порогового уровня, называются пейсмекерными потенциалами. (Как показано в других главах, часть волокон сердечной мышцы и некоторые типы нейронов ЦНС тоже обладают пейсмекерными потенциалами и могут спонтанно генерировать потенциалы действия при отсутствии внешних стимулов).

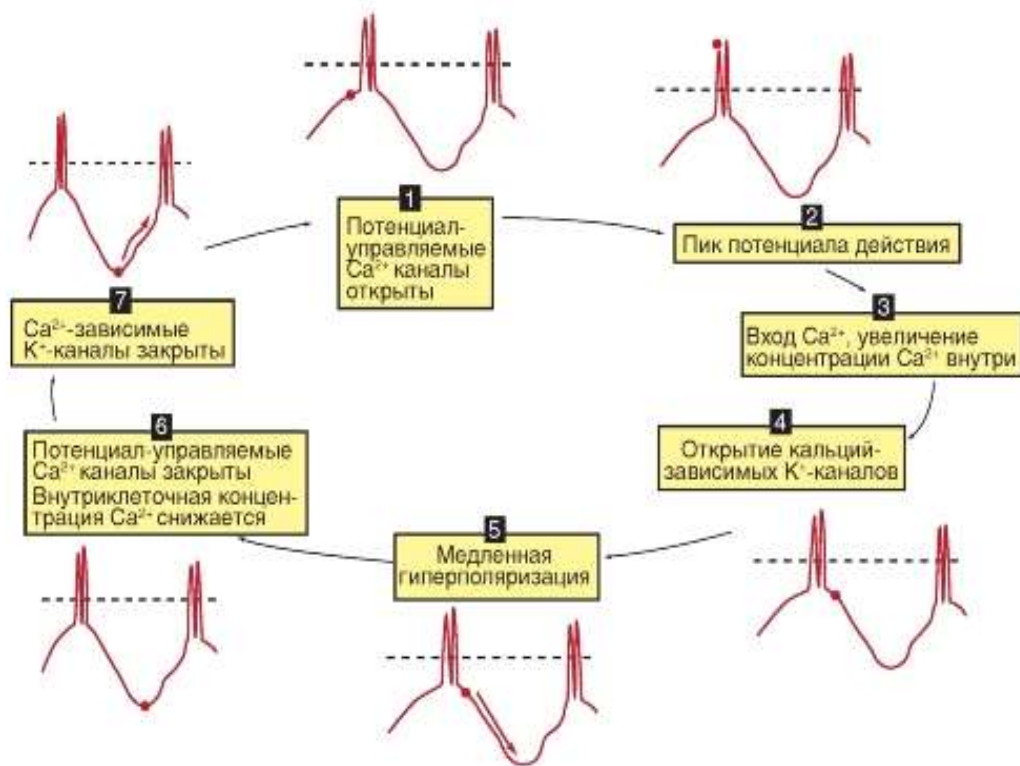
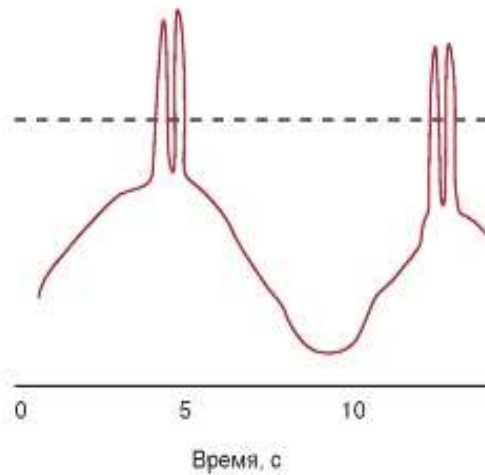
Интересно, что в гладких мышцах, способных к генерированию потенциалов действия, переносчиками положительных зарядов в клетку в фазу нарастания потенциала действия служат ионы Ca^{2+} , а не Na^+ , т.е. при деполяризации мембраны открываются потенциалзависимые кальциевые каналы, и потенциалы действия в гладкой мускулатуре имеют кальциевую природу, а не натриевую.

В отличие от поперечно-полосатой мышцы, в гладкой мышце цитоплазматическая концентрация Ca^{2+} может увеличиваться (или уменьшаться) в результате градуальных деполяризационных (или гиперполяризационных) сдвигов мембранного потенциала, увеличивающих (или уменьшающих) число открытых кальциевых каналов плазматической мембраны.

Какую роль в электромеханическом сопряжении играет внеклеточный Ca^{2+} ? В плазматической мембране гладких мышечных клеток находятся кальциевые каналы двух типов - потенциалзависимые и управляемые химическими посредниками. Поскольку концентрация Ca^{2+} во внеклеточной жидкости в 10 000 раз выше, чем в цитоплазме, открывание кальциевых каналов плазматической мембраны сопровождается входом Ca^{2+} в клетку. Благодаря небольшим размерам волокна, вошедшие ионы Ca^{2+} быстро достигают путем диффузии внутриклеточных участков связывания.

Еще одно различие заключается в том, что если в скелетной мышце одиночный потенциал действия высвобождает достаточное количество Ca^{2+} для включения всех поперечных мостиков волокна, то в гладкой мышце в ответ на большинство стимулов активируется только часть поперечных мостиков. Именно поэтому, гладкое мышечное волокно генерирует напряжение постепенно, по мере изменения цитоплазматической концентрации Ca^{2+} . Чем значительнее прирост концентрации Ca^{2+} , тем большее число поперечных мостиков активируется, и тем больше генерируемое напряжение.

Рис. 4-21. Электрические потенциалы гладких мышц



Источники поступления кальция в цитоплазму

Повышение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме, благодаря чему инициируется сокращение гладкой мышцы, обеспечивается из двух источников: (1) саркоплазматического ретикулума и (2) внеклеточной среды, из которой Ca^{2+} входит в клетку через кальциевые каналы плазматической мембраны. Относительный вклад этих двух источников Ca^{2+} варьирует для разных гладких мышц. Некоторые из них в большей мере зависят от внеклеточной концентрации Ca^{2+} , другие - от Ca^{2+} , депонированного в саркоплазматическом ретикулуме.

Саркоплазматический ретикулум гладких мышц

Что касается саркоплазматического ретикулума, то в гладкой мышце он развит слабее, чем в скелетной мышце, и не имеет специфической организации, которая коррелировала

бы с расположением толстых и тонких филаментов (рис. 4- 22 А). Кроме того, в гладкой мышце отсутствуют Т-трубочки, соединенные с плазматической мембраной. Поскольку диаметр гладкого мышечного волокна невелик, а сокращение развивается медленно, нет функциональной необходимости в быстром распространении возбуждающего сигнала вглубь волокна. Вместе с тем между участками плазматической мембраны и саркоплазматического ретикулума наблюдаются особые структуры, аналогичные специализированным контактам между мембранами Т-трубочек и латеральных мешков в поперечно-полосатых волокнах. Эти структуры осуществляют сопряжение между потенциалом действия плазматической мембраны и высвобождением Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума. В инициации высвобождения Ca^{2+} из областей саркоплазматического ретикулума, находящихся в центре волокна, участвуют вторичные посредники, высвобождаемые плазматической мембраной или образующиеся в цитоплазме в ответ на связывание внеклеточных химических медиаторов с рецепторами плазматической мембраны (рис. 4-22 В).

В некоторых гладких мышцах концентрация Ca^{2+} достаточна для поддержания активности поперечных мостиков на определенном низком уровне даже при отсутствии внешних стимулов. Такое явление носит название тонус гладкой мускулатуры. Интенсивность тонуса изменяют факторы, воздействующие на цитоплазматическую концентрацию Ca^{2+} .

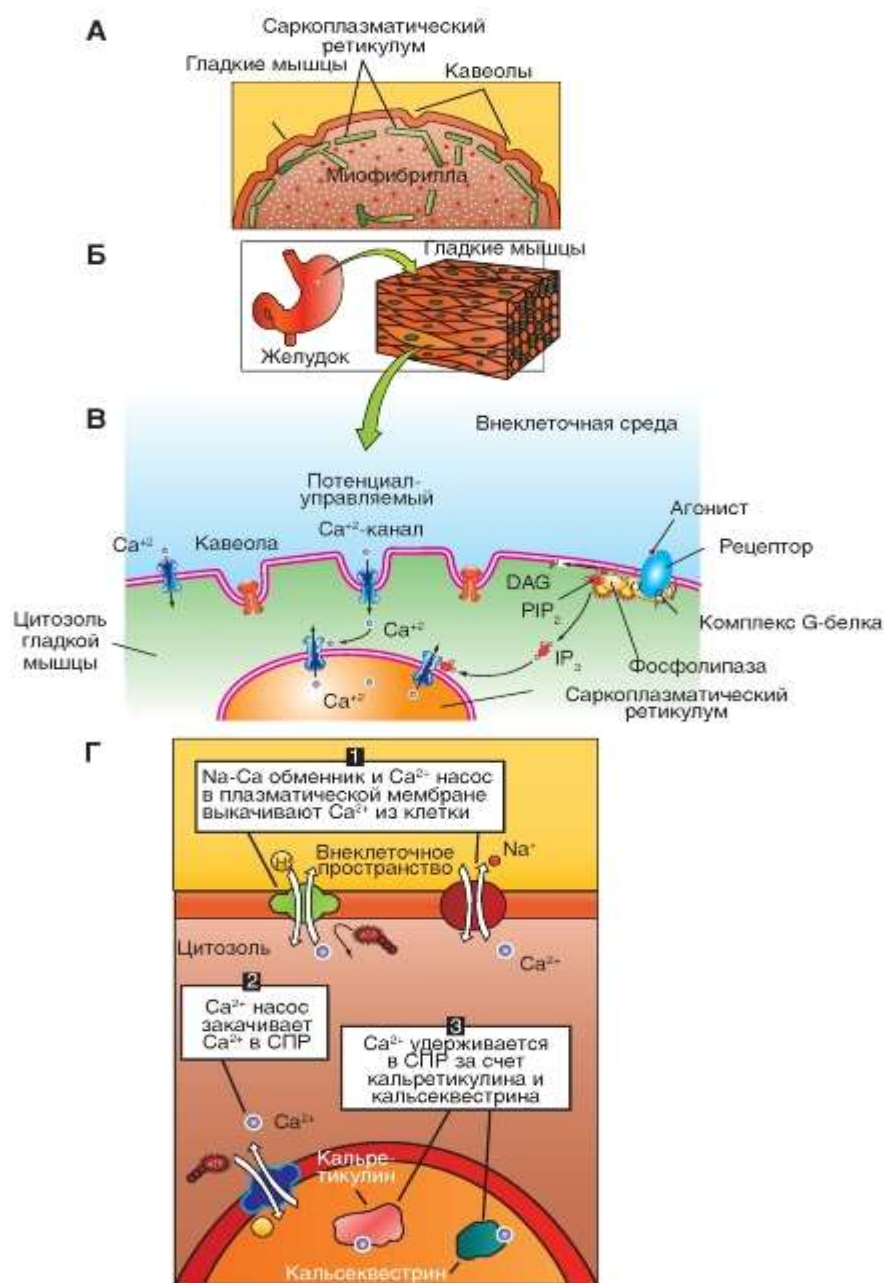
Удаление Ca^{2+} из цитоплазмы, необходимое для того, чтобы волокно расслабилось, происходит посредством активного транспорта Ca^{2+} обратно в саркоплазматический ретикулум, а также через плазматическую мембрану во внеклеточную среду. Скорость удаления Ca^{2+} в гладкой мышце гораздо меньше, чем в скелетной. Отсюда и разная продолжительность одиночного сокращения - несколько секунд для гладкой мышцы и доли секунды для скелетной.

Механизмы обмена кальцием представлены на

рис. 4-22 Г.

Рис. 4-22. Саркоплазматический ретикулум гладких мышц.

А - структура саркоплазматического ретикулума. Б - источники поступления кальция через ионные каналы. В - источники поступления кальция через насосы и обменники



Сокращения гладких мышц

В цитоплазме гладких мышечных волокон присутствуют два вида филаментов: толстые миозинсодержащие и тонкие актинсодержащие. Тонкие филаменты прикреплены либо к плазматической мембране, либо к цитоплазматическим структурам - так называемым плотным тельцам (функциональные аналоги Z-полос поперечно-полосатых волокон). В расслабленном гладком мышечном волокне филаменты обоого вида ориентированы под косым углом к длинной оси клетки. Во время укорочения волокна участки плазматической мембраны, находящиеся между точками прикрепления актина, выбухают. Толстые и тонкие филаменты не объединены в миофибриллы, как в поперечно-полосатых мышцах, и не образуют регулярно повторяющихся саркомеров, поэтому не наблюдается поперечная исчерченность. Тем не менее сокращение гладких мышц происходит посредством механизма скользящих нитей.

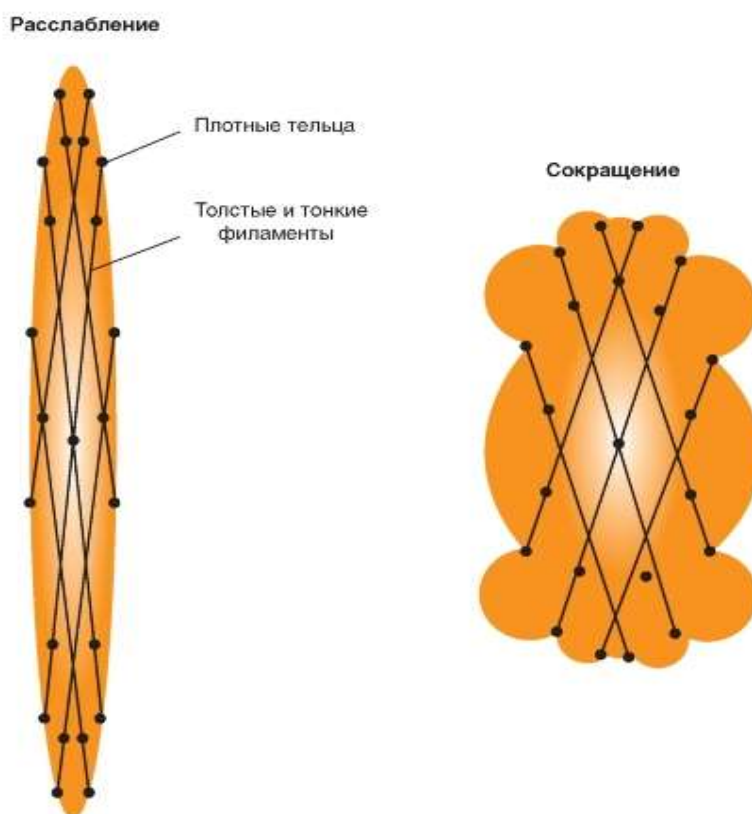
Концентрация миозина в гладкой мышце составляет лишь около одной трети от его содержания в поперечно-полосатой мышце, в то время как содержание актина может быть

в два раза больше. Несмотря на эти различия, максимальное напряжение на единицу площади поперечного сечения, развиваемое гладкими и скелетными мышцами, схоже.

Соотношение между изометрическим напряжением и длиной для гладких мышечных волокон количественно такое же, как для волокон скелетной мышцы. При оптимальной длине волокна развивается максимальное напряжение, а при сдвигах длины в обе стороны от ее оптимального значения напряжение уменьшается. Однако гладкая мышца, по сравнению со скелетной мышцей, способна развивать напряжение в более широком диапазоне значений длины. Это важное адаптационное свойство, если учесть, что большинство гладких мышц входит в состав стенок полых органов, при изменении объема которых меняется и длина мышечных волокон. Даже при относительно большом увеличении объема, как, например, при заполнении мочевого пузыря, гладкие мышечные волокна в его стенках сохраняют в определенной мере способность к развитию напряжения; в поперечно-полосатых волокнах подобное растяжение могло бы привести к расхождению толстых и тонких филаментов за пределы зоны их перекрывания.

Так же как в поперечно-полосатой мышце, в гладких мышечных волокнах сократительная активность регулируется изменениями цитоплазматической концентрации ионов Ca^{2+} . Однако эти два типа мышц существенно различаются по механизму влияния Ca^{2+} на активность поперечных мостиков и изменений концентрации Ca^{2+} в ответ на стимуляцию.

Рис. 4-23. В гладкой мышце толстые и тонкие филаменты ориентированы под углом к осям волокна и прикреплены к плазматической мембране или к плотным тельцам в цитоплазме. При активации мышечных клеток толстые и тонкие филаменты скользят друг относительно друга так, что клетки укорачиваются и утолщаются



Активация поперечных мостиков

В тонких филаментах гладких мышц нет связывающего Ca^{2+} -белка тропонина С, который опосредует триггерную роль Ca^{2+} по отношению к активности поперечных мостиков в скелетной мышце и в миокарде. Вместо этого цикл поперечных мостиков в гладкой мышце контролируется Ca^{2+} -регулируемым ферментом, фосфорилирующим миозин. Только фосфорилированная форма миозина в гладкой мышце может связываться с актином и обеспечивать циклы движений поперечных мостиков.

Рассмотрим процесс сокращения гладкой мышцы в деталях. Увеличение уровня Ca^{2+} в цитоплазме инициирует медленную цепь событий, приводящих, с одной стороны, к освобождению активного центра связывания с миозином на актине и, с другой стороны, к увеличению активности АТФазы миозина, и без этого увеличения активности АТФазы миозина в гладкой мышце сокращение не может начаться.

Первая фаза процесса активации головки миозина заключается в связывании 4 ионов Ca^{2+} с кальмодулином (CaM), который в этом смысле очень похож на тропонин С поперечно-полосатой мышцы. Далее комплекс Ca^{2+} -CaM активирует фермент, называемый киназой легкой цепи миозина (КЛЦМ) (*myosin light chain kinase, MLCK*). КЛЦМ содержит АТФ-связывающий домен и активный центр, обеспечивающий перенос фосфата с АТФ на белок-акцептор. По этому механизму КЛЦМ, в свою очередь, фосфорилирует легкую регуляторную цепь, ассоциированную с головкой молекулы миозина II. Фосфорилирование легкой цепи меняет конформацию головки миозина II, которая достаточно изменена увеличением своей АТФазной активности, что и позволяет ей взаимодействовать с актином. То есть система работает как молекулярный мотор (рис. 4-23 А).

На рисунке 4-23 Б представлены два независимых каскада, приводящих к сокращению гладкой мышцы. Каскад (1) включает механизм освобождения от блокирования активного центра актина, с которым должен связаться миозин. Каскад (2) включает механизм активации головки миозина. Итог этих двух каскадов состоит в формировании актомиозинового комплекса.

Рассмотрим первый каскад освобождения от блокирования активного центра актина. Два белка, кальдесмон и кальпомин, блокируют возможность связи актина с миозином. Оба представляют собой Ca^{2+} -CaM, связывающие протеины, и оба связывают актин. С одной стороны, Ca^{2+} связывается с CaM, и комплекс Ca^{2+} -CaM действует двояко на кальпонин. Первый эффект - комплекс Ca^{2+} -CaM связывается с кальпонином. Второй эффект - комплекс Ca^{2+} -CaM активирует Ca^{2+} -CaM-зависимую протеинкиназу, которая фосфорилирует кальпонин. Оба эффекта уменьшают ингибирование кальпонином АТФазной активности миозина. Кальдесмон также ингибирует АТФазную активность миозина гладкой мышцы. С другой стороны, Ca^{2+} связывается с CaM, а комплекс Ca^{2+} -CaM связывается через P_i с кальдесмоном, что сдвигает последний от центра связывания актина с миозином. Центр связывания на актине открывается.

Рассмотрим второй каскад, который представлен на панели А. Первая фаза процесса активации головки миозина заключается в связывании четырех ионов Ca^{2+} с CaM. Сформировавшийся комплекс Ca^{2+} -CaM активирует КЛЦМ. КЛЦМ фосфорилирует легкую регуляторную цепь, ассоциированную с головкой молекулы миозина II. Фосфорилирование легкой цепи меняет конформацию головки миозина II, которая достаточно изменена увеличением своей АТФазной активности, что и позволяет ей взаимодействовать с актином.

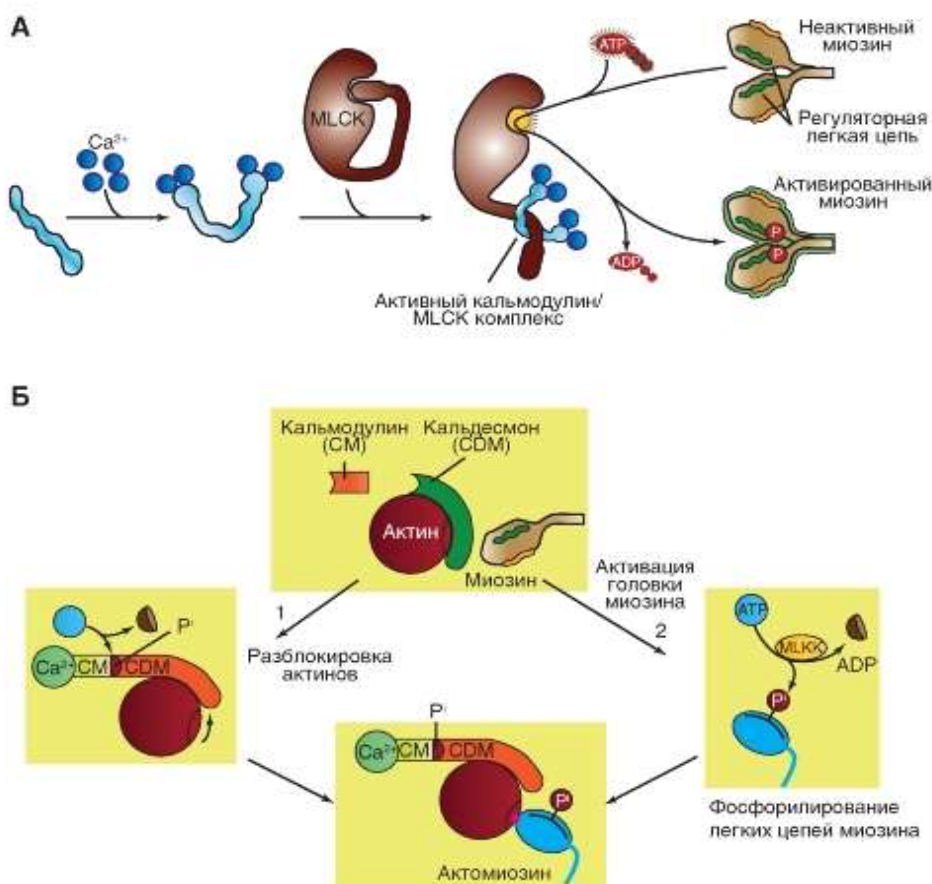
В итоге актомиозиновый комплекс оказывается сформированным.

Гладкомышечная изоформа АТФазы миозина характеризуется очень низкой максимальной активностью, примерно в 10-100 раз ниже, чем активность АТФазы

миозина скелетной мышцы. Поскольку от скорости гидролиза АТФ зависит скорость циклических движений поперечных мостиков и соответственно скорость укорочения, гладкая мышца сокращается гораздо медленнее, чем скелетная. Кроме того, гладкая мышца не утомляется во время продолжительной активности.

Чтобы после сокращения гладкая мышца расслабилась, необходимо дефосфорилирование миозина, так как дефосфорилированный миозин не может быть связан с актином. Этот процесс катализируется фосфатазой легких цепей миозина, активной в течение всего времени покоя и сокращения гладкой мышцы. При повышении цитоплазматической концентрации Ca^{2+} скорость фосфорилирования миозина активной киназой становится выше, чем скорость его дефосфорилирования фосфатазой, и количество фосфорилированного миозина в клетке возрастает, обеспечивая развитие напряжения. Когда концентрация Ca^{2+} в цитоплазме снижается, скорость дефосфорилирования становится выше, чем скорость фосфорилирования, количество фосфорилированного миозина падает, и гладкая мышца расслабляется.

При сохранении повышенного уровня цитоплазматического Ca^{2+} скорость гидролиза АТФ миозином поперечных мостиков падает, несмотря на сохраняющееся изометрическое напряжение. Если фосфорилированный поперечный мостик, прикрепленный к актину, подвергается дефосфорилированию, он окажется в состоянии стойкого ригидного напряжения, оставаясь неподвижным. Когда такие дефосфорилированные поперечные мостики связываются с АТФ, они диссоциируют от актина гораздо медленнее. Таким образом, обеспечивается способность гладкой мышцы длительно поддерживать напряжение при невысоком потреблении АТФ.



Глава 5. Нервная система

Отделы ЦНС

У ЦНС много функций. Она собирает и перерабатывает поступающую от ПНС информацию об окружающей среде, формирует рефлексы и другие поведенческие реакции, планирует (подготавливает) и осуществляет произвольные движения.

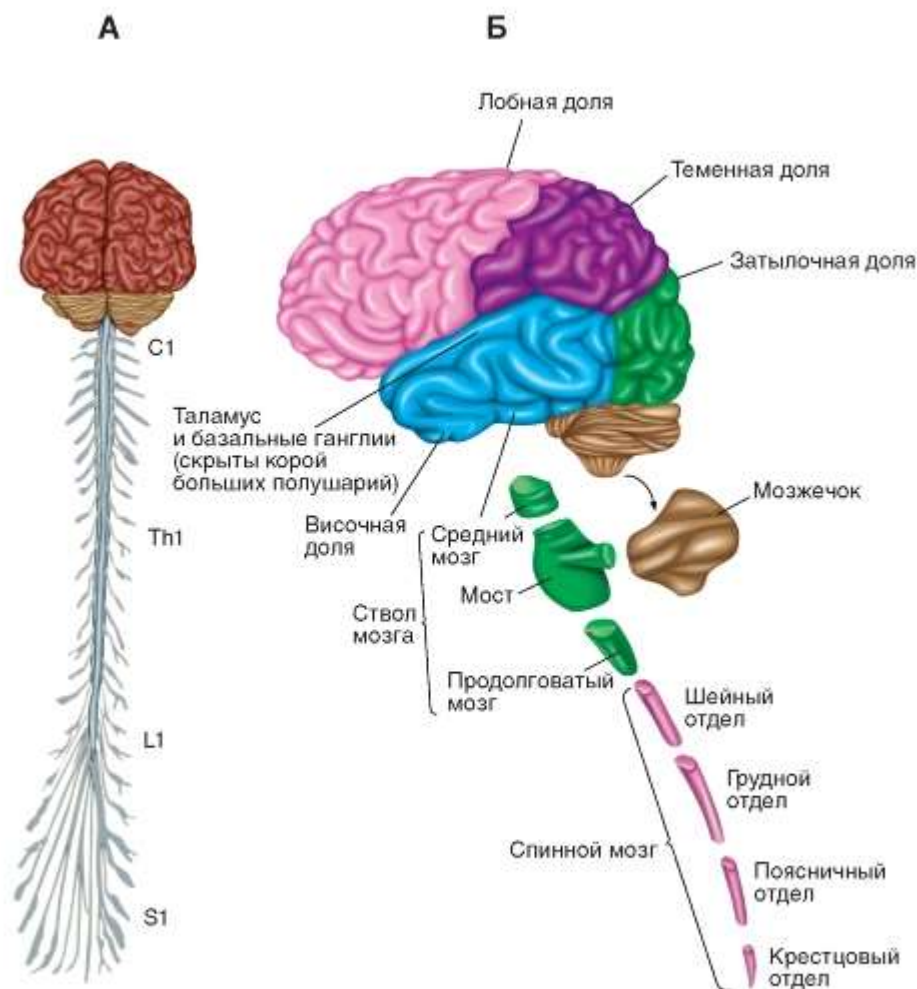
Кроме того, ЦНС обеспечивает, так называемые, высшие познавательные (когнитивные) функции. В ЦНС происходят процессы, связанные с памятью, обучаемостью и мышлением. ЦНС включает спинной мозг (*medulla spinalis*) и головной мозг (*encephalon*) (рис. 5-1). Спинной мозг подразделяется на последовательные отделы (шейный, грудной, поясничный, крестцовый и копчиковый), каждый из которых состоит из сегментов.

На основе сведений о закономерностях эмбрионального развития головной мозг подразделяют на пять отделов: *myelencephalon* (продолговатый мозг), *metencephalon* (задний мозг), *mesencephalon* (средний мозг), *diencephalon* (промежуточный мозг) и *telencephalon* (конечный мозг). В головном мозге взрослого *myelencephalon* (продолговатый мозг) включает продолговатый мозг (*medulla oblongata*, от *medulla*), *metencephalon* (задний мозг) - варолиев мост (*pons Varolii*) и мозжечок (*cerebellum*); *mesencephalon* (средний мозг) - *midbrain*; *diencephalon* (промежуточный мозг) - таламус (*thalamus*) и гипоталамус (*hypothalamus*), *telencephalon* (конечный мозг) - базальные ядра (*nuclei basales*) и кору большого мозга (*cortex cerebri*) (рис. 5-1 Б). В свою очередь, кора каждого полушария состоит из долей, которые названы так же, как соответствующие кости черепа: лобная (*lobus frontalis*), теменная (*l. parietalis*), височная (*l. temporalis*) и затылочная (*l. occipitalis*) доли. Полушария соединены мозолистым телом (*corpus callosum*) - массивным пучком аксонов, пересекающих среднюю линию между полушариями.

На поверхности ЦНС лежат несколько слоев соединительной ткани. Это мозговые оболочки: мягкая (*pia mater*), паутинная (*arachnoidea mater*) и твердая (*dura mater*). Они защищают ЦНС. Подпаутинное (субарахноидальное) пространство между мягкой и паутинной оболочками заполнено цереброспинальной (спинно-мозговой) жидкостью (ЦСЖ).

Рис. 5-1. Строение центральной нервной системы.

А - головной и спинной мозг со спинальными нервами. Обратите внимание на относительные размеры компонентов центральной нервной системы. C1, Th1, L1 и S1 - первые позвонки шейных, грудных, поясничных и крестцовых отделов соответственно. Б - основные компоненты центральной нервной системы. Показаны также четыре главные доли коры больших полушарий: затылочная, теменная, лобная и височная



Отделы головного мозга

Основные структуры головного мозга представлены на рис. 5-2 А. В ткани головного мозга есть полости -желудочки, заполненные ЦСЖ (рис. 5-2 Б, В). ЦСЖ оказывает амортизирующее действие и регулирует внеклеточную среду около нейронов. ЦСЖ образуется главным образом сосудистыми сплетениями, которые выстланы специализированными клетками эпендимы. Сосудистые сплетения находятся в боковых, третьем и четвертом желудочках. Боковые желудочки расположены по одному в каждом из двух больших полушарий мозга. Они соединяются с третьим желудочком через межжелудочковые отверстия (монроевы отверстия). Третий желудочек лежит на средней линии между двумя половинами промежуточного мозга. Он соединен четвертым желудочком посредством водопровода мозга (сильвиев водопровод), пронизывающего средний мозг. «Дно» четвертого желудочка образуют мост и продолговатый мозг, а «крышу» - мозжечок. Продолжением четвертого желудочка в каудальном направлении является центральный канал спинного мозга, обычно закрытый у взрослого человека.

ЦСЖ поступает из желудочков моста в субарахноидальное (подпаутинное) пространство через три отверстия в крыше четвертого желудочка: срединную апертуру (отверстие Мажанди) и две латеральные апертуры (отверстия Лушки). Вышедшая из системы желудочков ЦСЖ циркулирует в субарахноидальном пространстве, окружающем головной и спинной мозг. Расширения этого пространства

названы субарахноидальными (подпаутинными) цистернами. Одна из них - люмбальная (поясничная) цистерна, из которой получают путем люмбальной пункции пробы ЦСЖ для клинических анализов. Значительная часть ЦСЖ всасывается через снабженные клапанами арахноидальные ворсинки в венозные синусы твердой мозговой оболочки.

Общий объем ЦСЖ в желудочках мозга - примерно 35 мл, тогда как подпаутинное пространство содержит около 100 мл. Каждую минуту образуется примерно 0,35 мл ЦСЖ. При такой скорости обновление ЦСЖ происходит приблизительно четыре раза в сутки.

У человека в положении лежа давление ЦСЖ в спинно-мозговом субарахноидальном пространстве достигает 120-180 мм вод.ст. Скорость образования ЦСЖ относительно независима от давления в желудочках и в субарахноидальном пространстве, а также от системного кровяного давления. В то же время скорость обратного всасывания ЦСЖ прямо связана с давлением ЦСЖ.

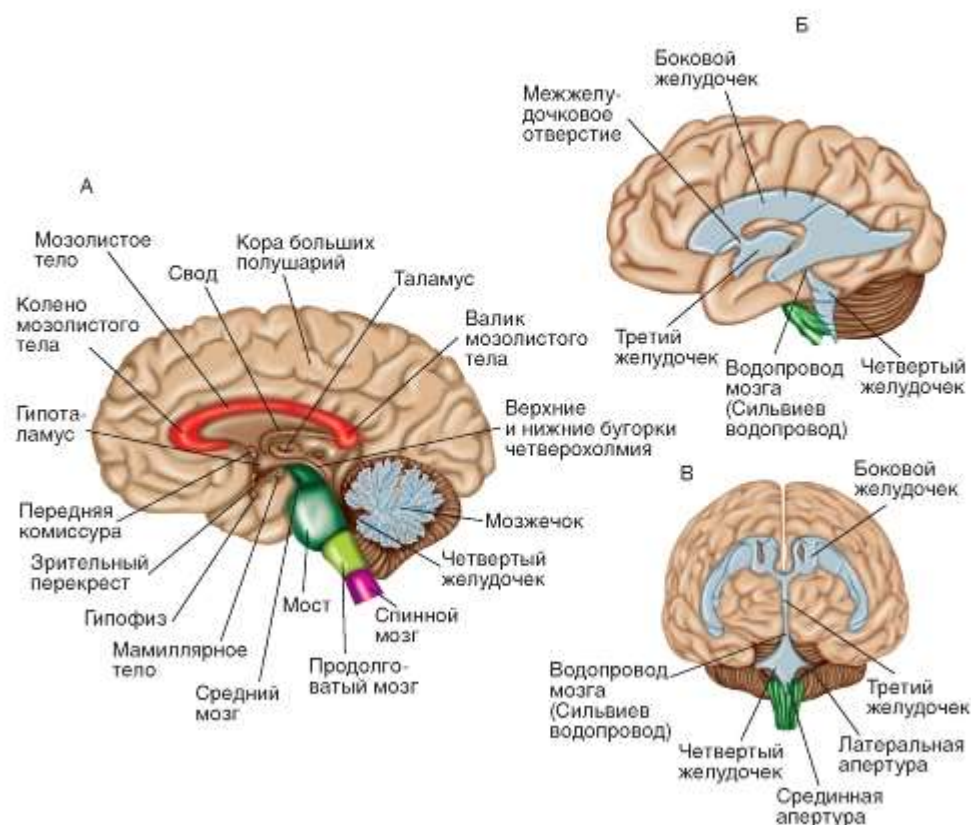
Внеклеточная жидкость в ЦНС непосредственно сообщается с ЦСЖ. Следовательно, состав ЦСЖ влияет на состав внеклеточной среды вокруг нейронов головного и спинного мозга. Основные компоненты ЦСЖ в поясничной цистерне перечислены в табл. 5-1. Для сравнения приведены концентрации соответствующих веществ в крови. Как показано в данной таблице, содержание K^+ , глюкозы и белков в ЦСЖ ниже, чем в крови, а содержание Na^+ и Cl^- - выше. Кроме того, в ЦСЖ практически нет эритроцитов. Благодаря повышенному содержанию Na^+ и Cl^- обеспечивается изотоничность ЦСЖ и крови, несмотря на то, что в ЦСЖ относительно мало белков.

Таблица 5-1. Состав цереброспинальной жидкости и крови

Компонент	Люмбальная ЦСЖ	Кровь
Na^+ , моль-экв/л	148	136-145
K^+ , моль-экв/л	2,9	3,5-5
Cl^- , моль-экв/л	120-130	100-106
Глюкоза, мг/дл	50-75	70-100
Белок, мг/дл	15-45	$6-8 \times 10^3$
pH	7,3	7,4

Рис. 5-2. Головной мозг.

А - среднесагиттальный срез головного мозга. Обратите внимание на относительное расположение коры больших полушарий, мозжечка, таламуса и ствола мозга, а также различных комиссур. Б и В - система желудочков мозга in situ - вид сбоку (Б) и спереди (В)



Организация спинного мозга

Спинной мозг лежит в позвоночном канале и у взрослых представляет собой длинный (45 см у мужчин и 41-42 см у женщин) несколько сплюснутый спереди назад цилиндрический тяж, который сверху (краниально) непосредственно переходит в продолговатый мозг, а внизу (каудально) оканчивается коническим заострением на уровне II поясничного позвонка. Знание этого факта имеет практическое значение (чтобы не повредить спинной мозг при поясничном проколе с целью взятия спинно-мозговой жидкости или с целью спинно-мозговой анестезии, надо вводить иглу шприца между остистыми отростками III и IV поясничных позвонков).

Спинной мозг на своем протяжении имеет два утолщения, соответствующих нервным корешкам верхней и нижней конечностей: верхнее из них называется шейным утолщением, а нижнее - поясничным. Из этих утолщений обширнее поясничное, но дифференцированнее шейное, что связано с более сложной иннервацией руки как органа труда.

В межпозвоночных отверстиях вблизи места соединения обоих корешков задний корешок имеет утолщение - спинно-мозговой узел (*ganglion spinale*), содержащий ложно-униполярные нервные клетки (афферентные нейроны) с одним отростком, который делится затем на две ветви. Одна из них, центральная, идет в составе заднего корешка в спинной мозг, а другая, периферическая, продолжается в спинно-мозговой нерв. Таким образом, в спинно-мозговых узлах отсутствуют синапсы, так как здесь лежат клеточные тела только афферентных нейронов. Этим названные узлы отличаются от вегетативных узлов ПНС, так как в последних вступают в контакты вставочные и эфферентные нейроны.

Спинной мозг состоит из серого вещества, содержащего нервные клетки, и белого вещества, состоящего из миелиновых нервных волокон.

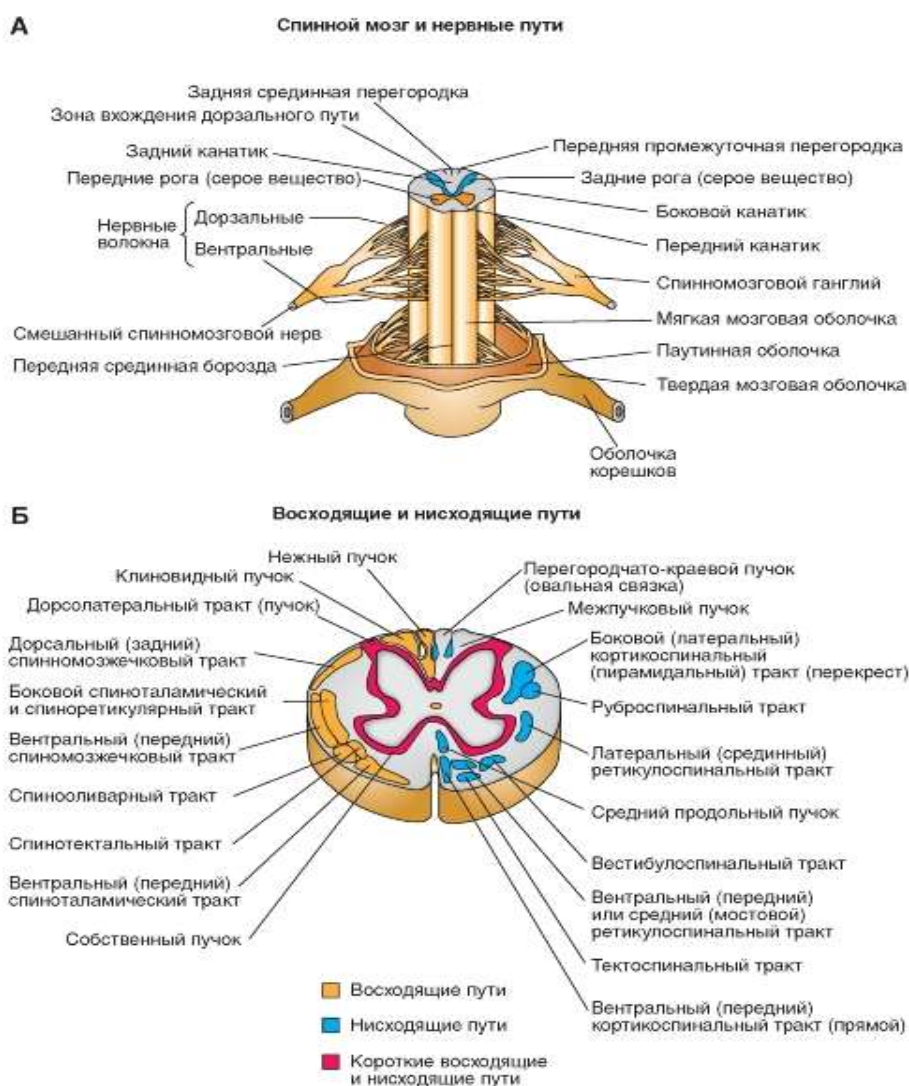
Серое вещество образует две вертикальные колонны, помещенные в правой и левой половине спинного мозга. В середине его заложен узкий центральный канал, содержащий спинно-мозговую жидкость. Центральный канал представляет собой остаток полости первичной нервной трубки, поэтому вверху он сообщается с IV желудочком головного мозга.

Серое вещество, окружающее центральный канал, носит название промежуточного вещества. В каждой колонне серого вещества различают два столба: передний и задний. На поперечных разрезах эти столбы имеют вид рогов: переднего, расширенного, и заднего, заостренного.

Серое вещество состоит из нервных клеток, группирующихся в ядра, расположение которых в основном соответствует сегментарному строению спинного мозга и его первичной трехчленной рефлекторной дуге. Первый чувствительный нейрон этой дуги лежит в спинно-мозговых узлах, периферический отросток его идет в составе нервов к органам и тканям и связывается там с рецепторами, а центральный проникает в спинной мозг в составе задних чувствительных корешков.

Рис. 5-3. Спинной мозг.

А - нервные пути спинного мозга; Б - поперечный срез спинного мозга. Проводящие пути



Строение нейрона

Функциональная единица нервной системы - нейрон. Типичный нейрон обладает воспринимающей поверхностью в виде клеточного тела (сомы) и нескольких отростков - дендритов, на которых находятся синапсы, т.е. межнейронные контакты. Аксон нервной клетки образует синаптические связи с другими нейронами или с эффекторными клетками. Коммуникативные сети нервной системы складываются из нейронных цепей, образованных синаптически взаимосвязанными нейронами.

Сома

В соме нейронов находятся ядро и ядрышко (рис. 5-4), а также хорошо развитый аппарат биосинтеза, который производит компоненты мембран, синтезирует ферменты и другие химические соединения, необходимые для специализированных функций нервных клеток. К аппарату биосинтеза в нейронах относятся тельца Ниссля - плотно прилегающие друг к другу сплюснутые цистерны гранулярного эндоплазматического ретикула, а также хорошо выраженный аппарат Гольджи. Кроме того, сома содержит многочисленные митохондрии и элементы цитоскелета, в том числе нейрофиламенты и микротрубочки. В результате неполной деградации мембранных компонентов образуется пигмент липофусцин, накапливающийся с возрастом в ряде нейронов. В некоторых группах нейронов ствола мозга (например, в нейронах черной субстанции и голубого пятна) замечен пигмент мелатонин.

Дендриты

Дендриты, отростки клеточного тела, у некоторых нейронов достигают длины более 1 мм, и на их долю приходится более 90% площади поверхности нейрона. В проксимальных частях дендритов (ближе к клеточному телу)

содержатся тельца Ниссля и участки аппарата Гольджи. Однако главные компоненты цитоплазмы дендритов - микротрубочки и нейрофиламенты. Было принято считать дендриты электрически не возбудимыми. Однако теперь известно, что дендриты многих нейронов обладают потенциалуправляемой проводимостью. Часто это обусловлено присутствием кальциевых каналов, при активации которых генерируются кальциевые потенциалы действия.

Аксон

Специализированный участок тела клетки (чаще сомы, но иногда - дендрита), от которого отходит аксон, называется аксонным холмиком. Аксон и аксонный холмик отличаются от сомы и проксимальных участков дендритов тем, что в них нет гранулярного эндоплазматического ретикула, свободных рибосом и аппарата Гольджи. В аксоне присутствуют гладкий эндоплазматический ретикулум и выраженный цитоскелет.

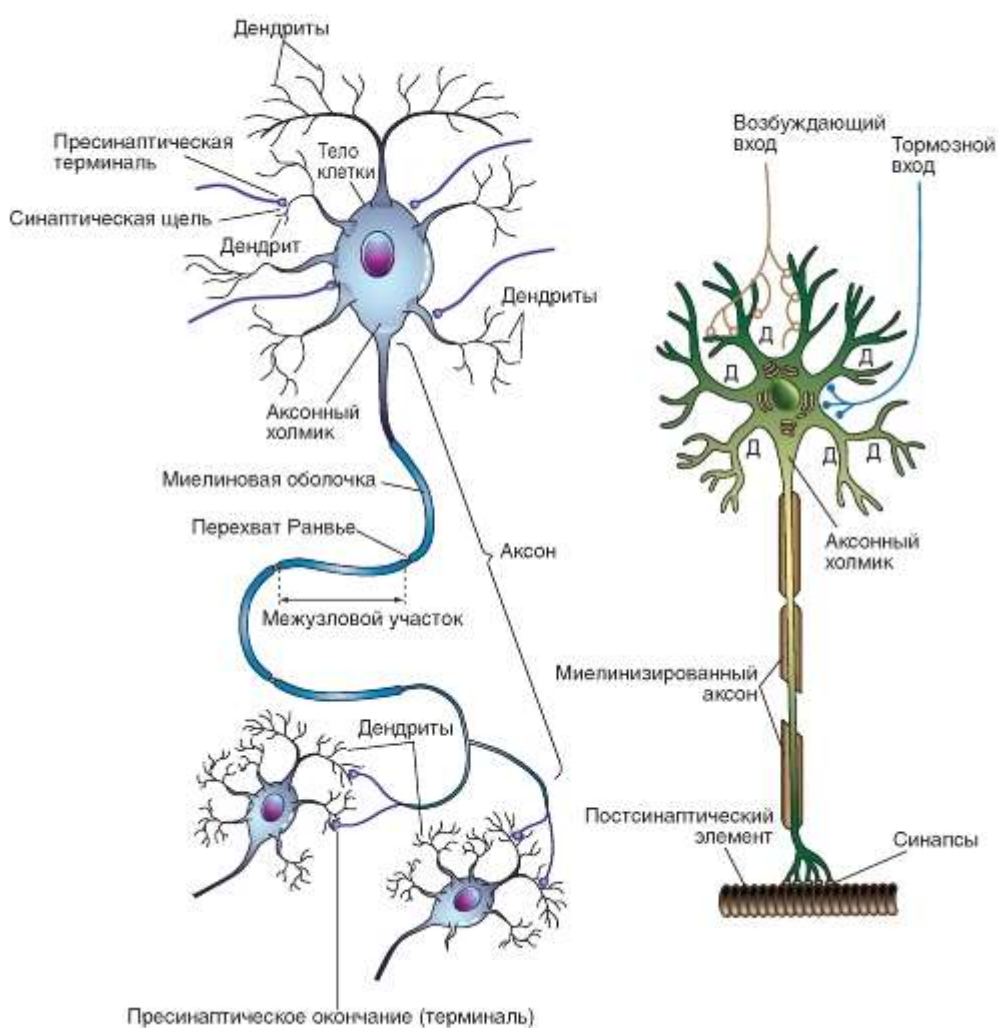
Нейроны можно классифицировать по длине их аксонов. У нейронов 1-го типа по Гольджи аксоны короткие, оканчивающиеся, так же как дендриты, близко к соме. Нейроны 2-го типа по Гольджи характеризуются длинными аксонами, иногда более 1 м.

Нейроны сообщаются друг с другом с помощью потенциалов действия, распространяющихся в нейронных цепях по аксонам. Потенциалы действия поступают от одного нейрона к следующему в результате синаптической передачи. В процессе передачи достигший пресинаптического окончания потенциал действия обычно запускает высвобождение нейромедиаторного вещества, которое либо возбуждает постсинаптическую клетку, так что в ней возникает разряд из одного или нескольких потенциалов действия, либо тормозит ее активность. Аксоны не только передают

информацию в нейронных цепях, но и доставляют путем аксонального транспорта химические вещества к синаптическим окончаниям.

Рис. 5-4. Схема «идеального» нейрона и его основных компонентов.

Большинство афферентных входов, поступающих по аксонам других клеток, оканчиваются синапсами на дендритах (Д), но некоторые - синапсами на соме. Возбуждающие нервные окончания чаще располагаются дистально на дендритах, а тормозные нервные окончания чаще находятся на соме



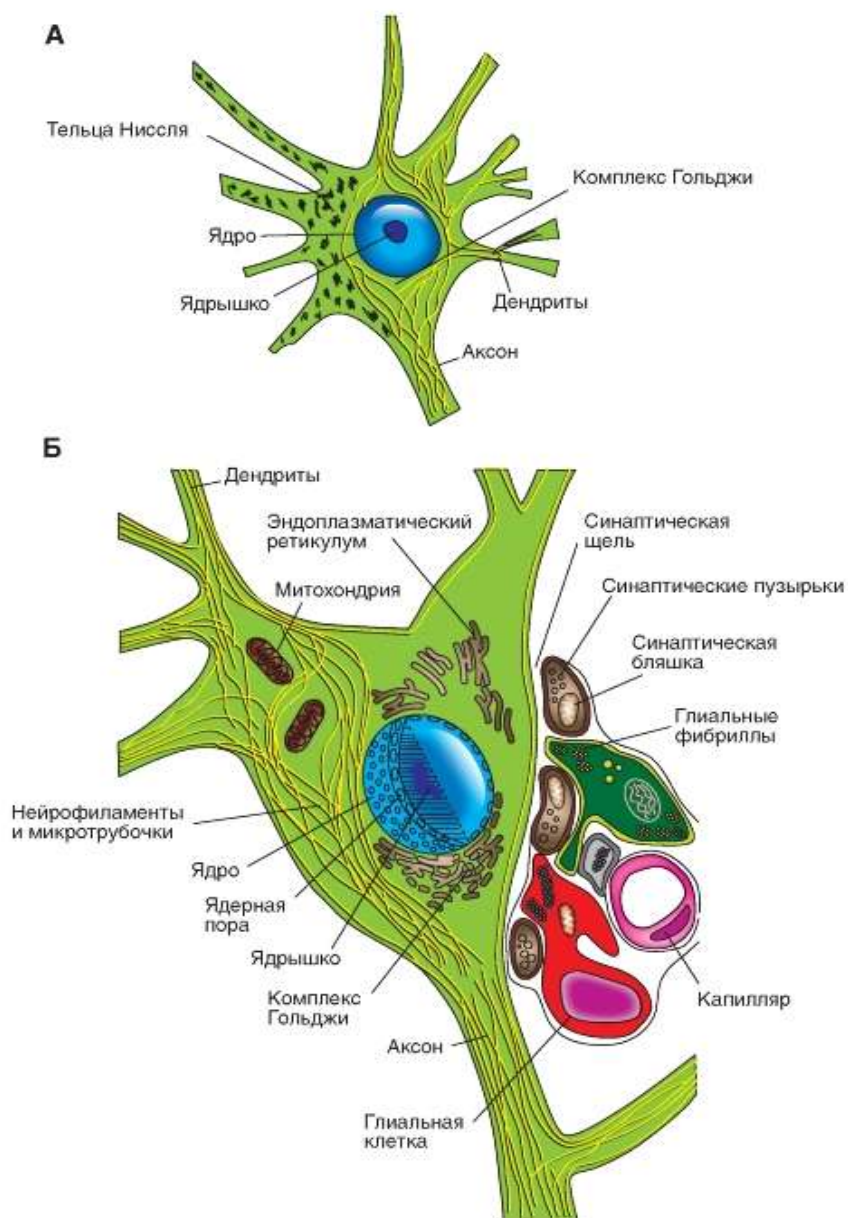
Органеллы нейрона

На рисунке 5-5 представлена сома нейронов. В соме нейронов показаны ядро и ядрышко, аппарат биосинтеза, который производит компоненты мембран, синтезирует ферменты и другие химические соединения, необходимые для специализированных функций нервных клеток. В него входят тельца Ниссля - плотно прилегающие друг к другу сплюснутые цистерны гранулярного эндоплазматического ретикулума, а также хорошо выраженный аппарат Гольджи. Сомы содержат митохондрии и элементы цитоскелета, в том числе нейрофиламенты и микротрубочки. В результате неполной деградации мембранных компонентов образуется пигмент липофусцин, накапливающийся

с возрастом в ряде нейронов. В некоторых группах нейронов ствола мозга (например, в нейронах черной субстанции и голубого пятна) заметен пигмент меланин.

Рис. 5-5. Нейрон.

А - органеллы нейрона. На схеме типичные органоиды нейрона показаны такими, какими они видны в световой микроскоп. Левая половина схемы отражает структуры нейрона после окрашивания по Нисслю: ядро и ядрышко, тельца Ниссля в цитоплазме сомы и проксимальных дендритах, а также аппарат Гольджи (неокрашенный). Обратите внимание на отсутствие телец Ниссля в аксонном холмике и аксоне. Часть нейрона после окрашивания солями тяжелых металлов: видны нейрофибриллы. При соответствующем окрашивании солями тяжелых металлов можно наблюдать аппарат Гольджи (в данном случае не показан). На поверхности нейрона находятся несколько синаптических окончаний (окрашены солями тяжелых металлов). Б - Схема соответствует электронно-микроскопической картине. Видны ядро, ядрышко, хроматин, ядерные поры. В цитоплазме видны митохондрии, шероховатый эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, нейрофиламенты и микротрубочки. На наружной стороне плазматической мембраны - синаптические окончания и отростки астроцитов



Типы нейронов

Нейроны очень разнообразны. Нейроны разного типа выполняют специфичные коммуникативные функции, что отражается на их строении. Так, нейроны ганглиев задних корешков (спинальных ганглиев) получают информацию не путем синаптической передачи, а от сенсорных нервных окончаний в органах. Клеточные тела этих нейронов лишены дендритов (рис. 5-6 А5) и не получают синаптических окончаний. Выйдя из клеточного тела, аксон такого нейрона разделяется на две ветви, одна из которых (периферический отросток) направляется в составе периферического нерва к сенсорному рецептору, а другая ветвь (центральный отросток) входит в спинной мозг (в составе заднего корешка) либо в ствол мозга (в составе черепного нерва).

Нейроны другого типа, такие, как пирамидные клетки коры больших полушарий и клетки Пуркинью коры мозжечка, заняты переработкой информации (рис. 5-6 А1, А2). Их дендриты покрыты дендритными шипиками и характеризуются обширной поверхностью. Они имеют огромное количество синаптических входов.

Рис. 5-6. Типы нейронов

А - нейроны разнообразной формы: 1 - нейрон, напоминающий пирамиду. Нейроны такого типа, называемые пирамидными клетками, характерны для коры больших полушарий. Обратите внимание на отростки-шипики, усеивающие поверхность дендритов; 2 - клетки Пуркинью, названные по имени впервые описавшего их чешского нейроанатома Яна Пуркинью. Они находятся в коре мозжечка. У клеток грушевидное тело; по одну сторону от сомы располагается обильное сплетение дендритов, по другую - аксон. Тонкие ветви дендритов покрыты шипиками (на схеме не показаны); 3 - постганглионарный симпатический мотонейрон; 4 - альфа-мотонейрон спинного мозга. Он, так же как постганглионарный симпатический мотонейрон (3), мультиполярный, с радиальными дендритами; 5 - сенсорная клетка спинального ганглия; не имеет дендритов. Ее отросток разделяется на две ветви: центральную и периферическую. Поскольку в процессе эмбрионального развития аксон образуется в результате слияния двух отростков, эти нейроны считаются не униполярными, а псевдоуниполярными. Б - типы нейронов.

Виды ненейронных клеток

Еще одна группа клеточных элементов нервной системы - нейроглия (рис. 5-7 А), или поддерживающие клетки. В ЦНС человека число нейроглияльных клеток на порядок больше, чем число нейронов: 10^{13} и 10^{12} соответственно. Нейроглия не принимает прямого участия в краткосрочных коммуникативных процессах в нервной системе, но способствует осуществлению этой функции нейронами. Так, нейроглияльные клетки определенного типа образуют вокруг многих аксонов миелиновую оболочку, значительно увеличивающую скорость проведения потенциалов действия. Это позволяет аксонам быстро передавать информацию к удаленным клеткам.

Типы нейроглии

Глияльные клетки поддерживают деятельность нейронов (рис. 5-7 Б). В ЦНС к нейроглии относят астроциты и олигодендроциты, а в ПНС - шванновские клетки и клетки-сателлиты. Кроме того, центральными глиальными клетками считаются клетки микроглии и клетки эпендимы.

Астроциты (получившие название благодаря своей звездчатой форме) регулируют микросреду вокруг нейронов ЦНС, хотя контактируют они только с частью поверхности центральных нейронов (рис. 5-7 А). Однако их отростками окружены группы синаптических окончаний, которые в результате изолированы от соседних синапсов. Особые отростки - «ножки» астроцитов образуют контакты с капиллярами и с

соединительной тканью на поверхности ЦНС - с мягкой мозговой оболочкой (рис. 5-7 А). Ножки ограничивают свободную диффузию веществ в ЦНС. Астроциты могут активно поглощать K^+ и нейромедиаторные вещества, затем метаболизируя их. Таким образом, астроциты играют буферную роль, перекрывая прямой доступ для ионов и нейромедиаторов во внеклеточную среду вокруг нейронов. В цитоплазме астроцитов находятся глиальные филаменты, выполняющие в ткани ЦНС механическую опорную функцию. В случае повреждения отростки астроцитов, содержащие глиальные филаменты, подвергаются гипертрофии и формируют глиальный «рубец».

Другие элементы нейроглии обеспечивают электрическую изоляцию нейронных аксонов. Многие аксоны покрыты изолирующей миелиновой оболочкой. Это многослойная обертка, спирально намотанная поверх плазматической мембраны аксонов. В ЦНС миелиновую оболочку создают мембраны клеток олигодендроглии (рис. 5-7 Б3). В ПНС миелиновая оболочка образована мембранами шванновских клеток (рис. 5-7 Б2). Немиелинизированные (безмякотные) аксоны ЦНС не имеют изолирующего покрытия.

Миелин увеличивает скорость проведения потенциалов действия благодаря тому, что ионные токи во время потенциала действия входят и выходят только в перехватах Ранвье (областях прерыва между соседними миелинизирующими клетками). Таким образом, потенциал действия «перескакивает» от перехвата к перехвату - так называемое сальтаторное проведение.

Кроме того, в состав нейроглии входят клеточисателлиты, инкапсулирующие нейроны ганглиев спинальных и черепных нервов, регулируя микросреду вокруг этих нейронов наподобие того, как это делают астроциты. Еще один вид клеток - микроглия, или латентные фагоциты. В случае повреждения клеток ЦНС микроглия способствует удалению продуктов клеточного распада. В этом процессе участвуют другие клетки нейроглии, а также фагоциты, проникающие в ЦНС из кровотока. Ткань ЦНС отделена от ЦСЖ, заполняющей желудочки мозга, эпителием, сформированным эпендимными клетками (рис. 5-7 А). Эпендима обеспечивает диффузию многих веществ между внеклеточным пространством мозга и ЦСЖ. Специализированные эпендимные клетки сосудистых сплетений в системе желудочков секретируют значительную долю ЦСЖ.

Рис. 5-7. Нейронные клетки.

А - схематическое представление нейронных элементов центральной нервной системы. Изображены два астроцита, ножки отростков которых заканчиваются на синапсах и дендритах нейрона, а также контактируют с мягкой мозговой оболочкой и/или капиллярами. Олигодендроцит формирует миелиновую оболочку аксонов. Показаны также клетки микроглии и клетки эпендимы. Б - разные типы клеток нейроглии в центральной нервной системе: 1 - фибриллярный астроцит; 2 - протоплазматический астроцит. Обратите внимание на астроцитарные ножки, контактирующие с капиллярами (см. 5-7 А); 3 - олигодендроцит. Каждый из его отростков обеспечивает формирование одной или более межперехватных миелиновых оболочек вокруг аксонов центральной нервной системы; 4 - клетки микроглии; 5 - клетки эпендимы

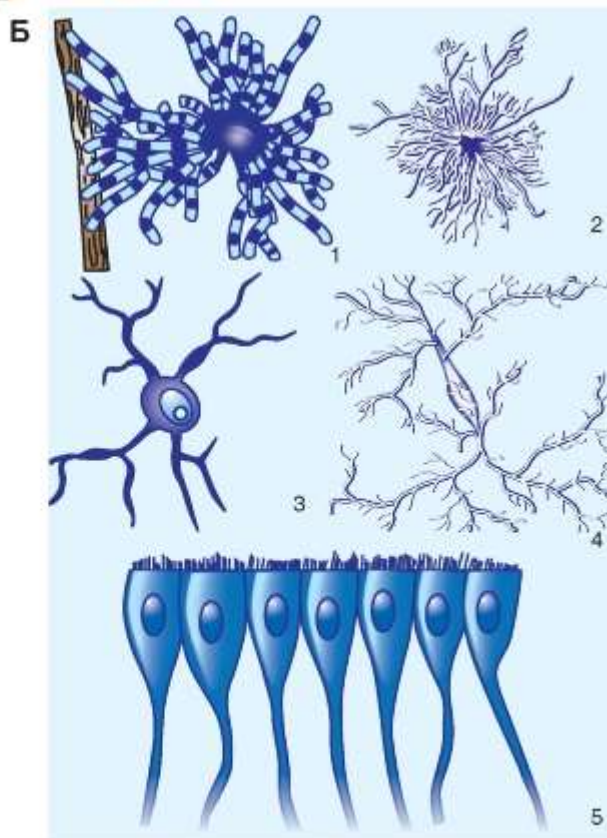
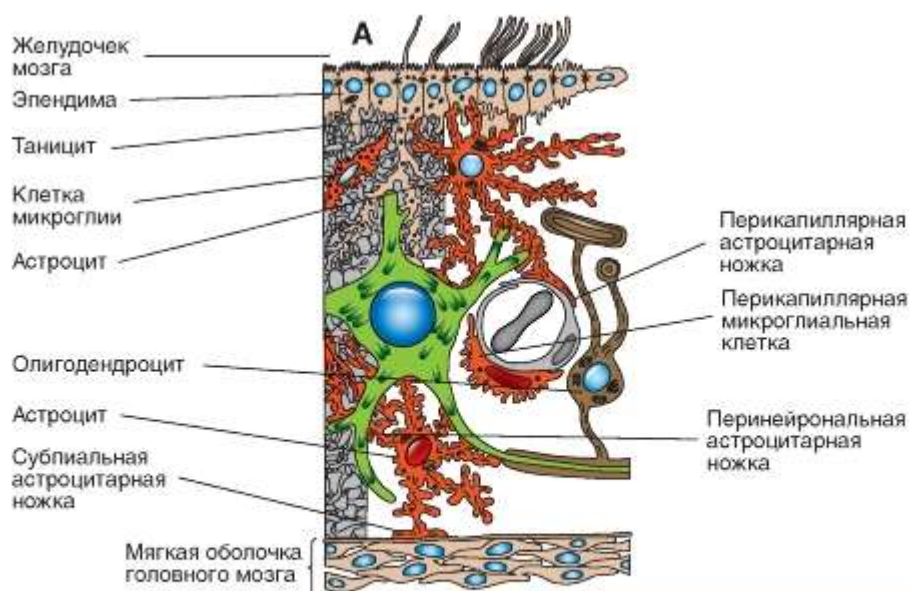


Схема распространения информации по нейрону

В зоне синапса локально образовавшийся ВПСП распространяется пассивно электротонически по всей постсинаптической мембране клетки. Это распространение не подчиняется закону «все или ничего». Если большое число возбуждающих синапсов возбуждаются одновременно или почти одновременно, то возникает явление суммации, проявляющееся в виде возникновения ВПСП существенно большей амплитуды, что может деполяризовать мембрану всей постсинаптической клетки. Если величина этой деполяризации достигает в области постсинаптической мембраны определенного порогового значения (10 мВ или больше), то на аксонном холмике нервной клетки молниеносно открываются потенциалуправляемые Na^+ -каналы, и клетка генерирует потенциал действия, проводящийся вдоль ее аксона. При обильном освобождении трансмиттера постсинаптический потенциал может появиться уже через

0,5-0,6 мс после пришедшего в пресинаптическую область потенциала действия. От начала ВПСП до образования потенциала действия проходит еще около 0,3 мс.

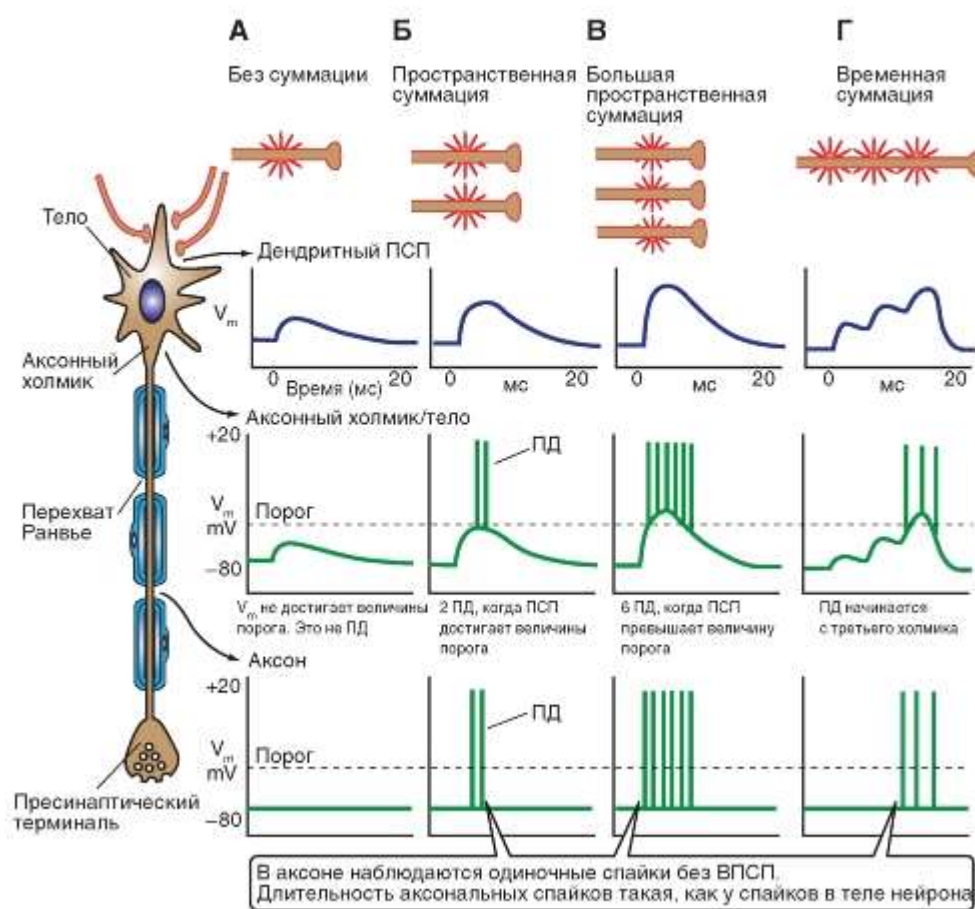
Пороговый стимул - самый слабый стимул, надежно различаемый сенсорным рецептором. Для этого стимул должен вызывать рецепторный потенциал такой амплитуды, которая достаточна для активации хотя бы одного первичного афферентного волокна. Более слабые стимулы могут вызвать подпороговый рецепторный потенциал, однако они не приведут к возбуждению центральных сенсорных нейронов и, следовательно, не будут восприняты. Кроме того, количество возбужденных первичных афферентных нейронов, необходимое для сенсорного восприятия, зависит от пространственной и временной суммации в сенсорных путях (рис. 5-8 Б, Г).

Взаимодействуя с рецептором, молекулы АЦХ открывают неспецифические ионные каналы в постсинаптической мембране клетки так, что повышается их способность к проводимости одновалентных катионов. Работа каналов ведет к базовому входящему току положительных ионов, и, следовательно, к деполяризации постсинаптической мембраны, которая применительно к синапсам называется возбуждающим постсинаптическим потенциалом.

Ионные токи, участвующие в возникновении ВПСП, ведут себя иначе, нежели токи натрия и калия во время генерации потенциала действия. Причина заключается в том, что в механизме генерации ВПСП участвуют другие ионные каналы с другими свойствами (лигандуправляемые, а не потенциалуправляемые). При потенциале действия активируются потенциалуправляемые ионные каналы, и с увеличивающейся деполяризацией открываются следующие каналы, так что процесс деполяризации усиливает сам себя. В то же время проводимость транзиттеруправляемых каналов (лигандуправляемых) зависит только от количества молекул транзиттера, связавшихся с молекулами рецептора (в результате чего открываются транзиттеруправляемые ионные каналы) и, следовательно, от числа открытых ионных каналов. Амплитуда ВПСП лежит в диапазоне от 100 $\mu\text{В}$ до в некоторых случаях 10 мВ. В зависимости от вида синапса, общая продолжительность ВПСП у некоторых синапсов находится в диапазоне от 5 до 100 мс.

Рис. 5-8. Информация течет от дендритов к соме, к аксону, к синапсу.

На рисунке представлены типы потенциалов в разных местах нейрона в зависимости от пространственной и временной суммации



Рефлекс - это ответная реакция на специфичный стимул, осуществляющаяся при обязательном участии нервной системы. Нейронная цепь, обеспечивающая конкретный рефлекс, называется рефлекторной дугой.

В наиболее простом виде рефлекторная дуга соматической нервной системы (рис.5-9 А), как правило, состоит из сенсорных рецепторов определенной модальности (первое звено рефлекторной дуги), информация с которых поступает в центральную нервную систему по аксону чувствительной клетки, расположенной в спинном ганглии вне пределов центральной нервной системы (второе звено рефлекторной дуги). В составе заднего корешка спинного мозга аксон чувствительной клетки входит в задние рога спинного мозга где образует синапс на вставочном нейроне. Аксон вставочного нейрона идет не прерываясь в передние рога, где образует синапс на α -мотонейроне (вставочный нейрон и α -мотонейрон, как структуры, находящиеся в центральной нервной системе, являются третьим звеном рефлекторной дуги). Аксон α -мотонейрона выходит из передних рогов в составе переднего корешка спинного мозга (четвертое звено рефлекторной дуги) и направляется в скелетную мышцу (пятое звено рефлекторной дуги), образуя мионевральные синапсы на каждом мышечном волокне.

Наиболее простая схема рефлекторной дуги вегетативной симпатической нервной системы (рис. 5-9 Б), обычно состоит из сенсорных рецепторов (первое звено рефлекторной дуги), информация с которых поступает в центральную нервную систему по аксону чувствительной клетки, расположенной в спинном или другом чувствительном ганглии вне пределов центральной нервной системы (второе звено рефлекторной дуги). Аксон чувствительной клетки в составе заднего корешка входит в

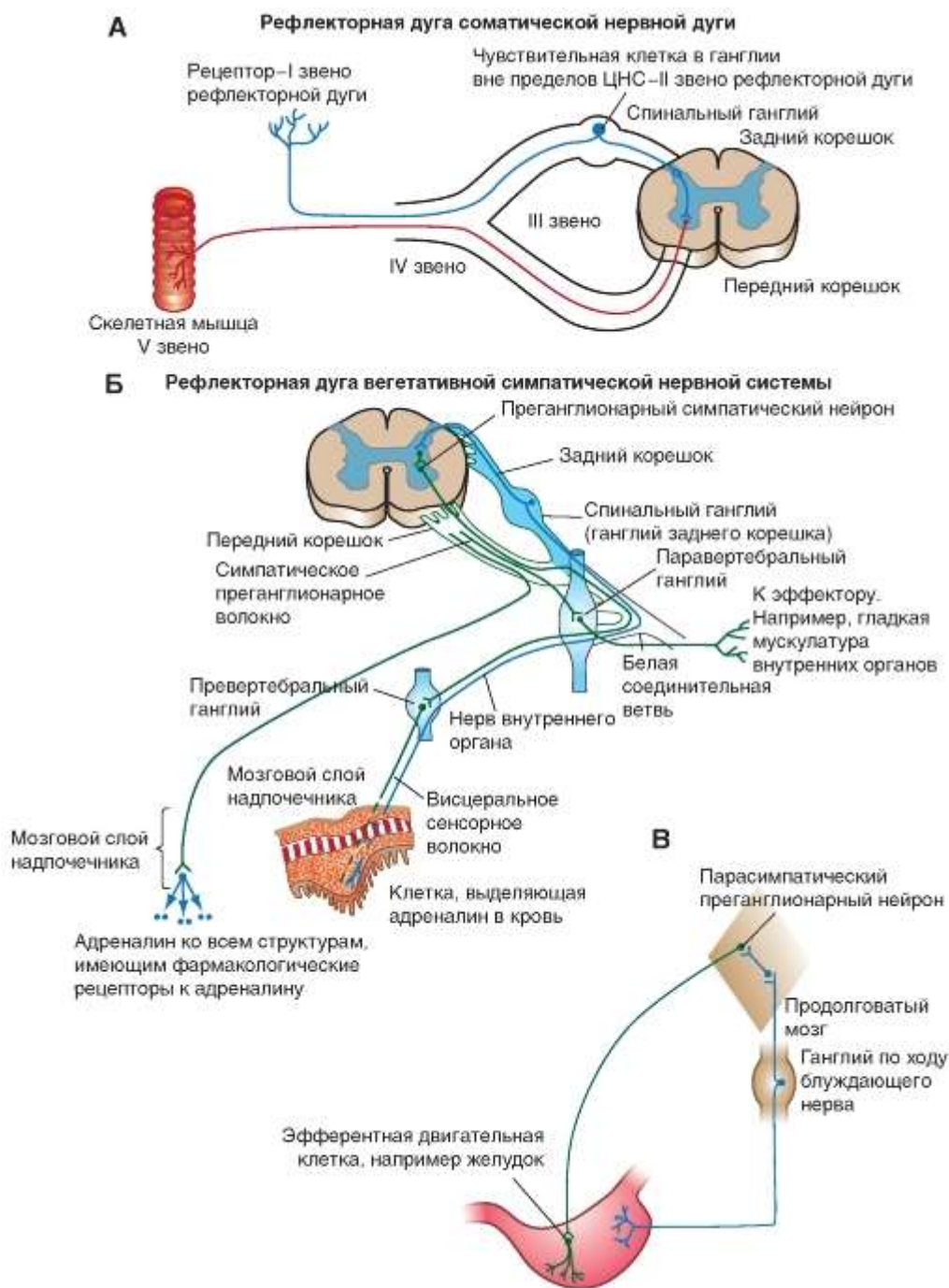
задние рога спинного мозга, где образует синапс на вставочном нейроне. Аксон вставочного нейрона идет в боковые рога, где образует синапс на преганглионарном симпатическом нейроне (в грудном и поясничном отделах). (Вставочный нейрон и преганглионарный симпатический нейрон - это третье звено рефлекторной дуги). Аксон преганглионарного симпатического нейрона выходит из спинного мозга в составе передних корешков (четвертое звено рефлекторной дуги). Дальнейшие три варианта путей этого типа нейрона объединены на схеме.

В первом случае аксон преганглионарного симпатического нейрона уходит в паравертебральный ганглий где образует синапс на нейроне, аксон которого идет к эффектору (пятое звено рефлекторной дуги), например, к гладкой мускулатуре внутренних органов, к секреторным клеткам и др. Во втором случае аксон преганглионарного симпатического нейрона уходит в превертебральный ганглий, где образует синапс на нейроне, аксон которого идет к внутреннему органу (пятое звено рефлекторной дуги). В третьем случае, аксон преганглионарного симпатического нейрона уходит в мозговой слой надпочечников, где образует синапс на специальной клетке, выделяющей адреналин в кровь (все это - четвертое звено рефлекторной дуги). В этом случае, адреналин через кровь поступает ко всем структурам - мишеням, имеющим к нему фармакологические рецепторы (пятое звено рефлекторной дуги).

В наиболее простом виде рефлекторная дуга вегетативной парасимпатической нервной системы (рис. 5-9 В) состоит из сенсорных рецепторов - первое звено рефлекторной дуги (расположенных, например, в желудке), которые посылают информацию в центральную нервную систему по аксону чувствительной клетки, расположенной в ганглии, находящемся по ходу блуждающего нерва (второе звено рефлекторной дуги). Аксон чувствительной клетки передает информацию напрямую в продолговатый мозг, где образуется синапс на нейроне, аксон которого (также в пределах продолговатого мозга) образует синапс на парасимпатическом преганглионарном нейроне (третье звено рефлекторной дуги). От него аксон, например в составе блуждающего нерва, возвращается в желудок и образует синапс на эфферентной клетке (четвертое звено рефлекторной дуги) аксон которой ветвится по ткани желудка (пятое звено рефлекторной дуги), образуя нервные окончания.

Рис. 5-9. Схемы основных рефлекторных дуг.

А - Рефлекторная дуга соматической нервной системы. Б - Рефлекторная дуга вегетативной симпатической нервной системы. В - Рефлекторная дуга вегетативной парасимпатической нервной системы



Вкусовые рецепторы

Знакомые всем нам вкусовые ощущения на самом деле представляют собой смеси четырех элементарных вкусовых качеств: соленого, сладкого, кислого и горького. Особенно эффективно вызывают соответствующие вкусовые ощущения четыре вещества: хлорид натрия (NaCl), сахараза, соляная кислота (HCl) и хинин.

Пространственное распределение и иннервация вкусовых почек

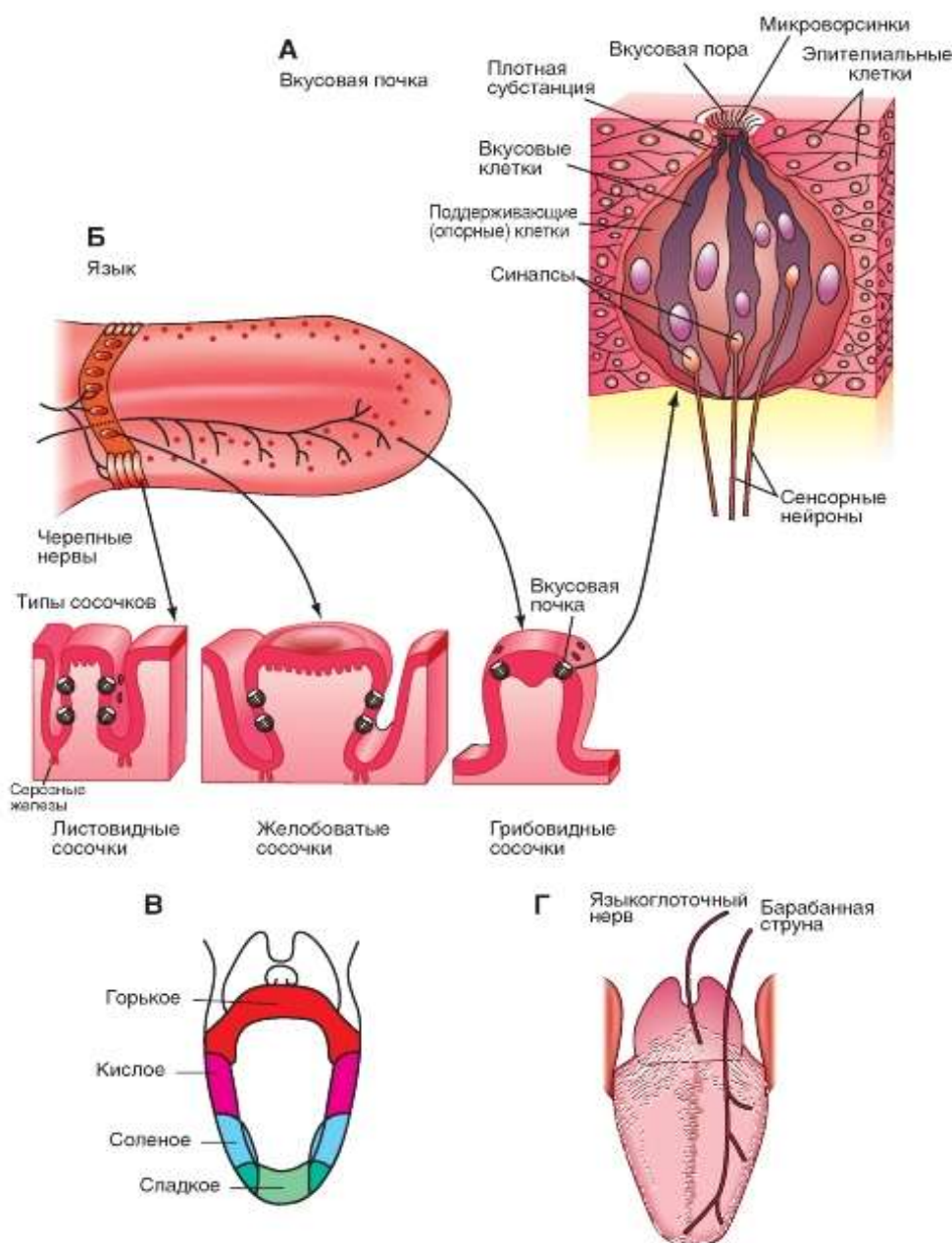
Вкусовые почки содержатся во вкусовых сосочках разного типа на поверхности языка, нёба, глотки и гортани (рис. 5-10 А). На передней и боковой части языка расположены грибовидные и листовидные сосочки, а на поверхности корня языка - желобоватые. В состав последних может входить несколько сотен вкусовых почек, общее число которых у человека достигает нескольких тысяч.

Специфическая вкусовая чувствительность не одинакова в разных зонах поверхности языка (рис. 5-10 Б, В). Сладкий вкус лучше всего воспринимается кончиком языка, соленый и кислый - боковыми зонами, а горький - основанием (корнем) языка.

Вкусовые почки иннервируются тремя черепными нервами, два из которых показаны на рис. 5-10 Г. Барабанная струна (*chorda tympani* - ветвь лицевого нерва) снабжает вкусовые почки передних двух третей языка, языкоглоточный нерв - задней трети (рис. 5-10 Г). Блуждающий нерв иннервирует некоторые вкусовые почки гортани и верхней части пищевода.

Рис. 5-10 Химическая чувствительность - вкус и его основы.

А - вкусовая почка. Организация вкусовых почек в сосочках трех типов. Показана вкусовая почка с вкусовым отверстием на вершине и отходящими снизу нервами, а также хеморецепторные клетки двух типов, поддерживающие (опорные) и вкусовые клетки. Б - представлены три типа сосочков на поверхности языка. В - распределение зон четырех элементарных вкусовых качеств на поверхности языка. Г - иннервация двух передних третей и задней трети поверхности языка лицевым и языкоглоточным нервами



Вкусовая почка

Вкусовые ощущения возникают при активации хеморецепторов во вкусовых почках (вкусовых луковицах). Каждая вкусовая почка (*caliculus gustatorius*) содержит от 50 до 150 сенсорных (хеморецептивных, вкусовых) клеток, а также включает поддерживающие (опорные) и базальные клетки (рис. 5-11 А). Базальная часть сенсорной клетки образует синапс на окончании первичного афферентного аксона. Есть два типа хеморецептивных клеток, содержащих разные синаптические пузырьки: с электронно-плотным центром либо круглые прозрачные пузырьки. Апикальная поверхность клеток покрыта микроворсинками, направленными к вкусовой поре.

Хеморецепторные молекулы микроворсинок взаимодействуют со стимулирующими молекулами, попадающими во вкусовую пору (вкусовое отверстие) из жидкости, омывающей вкусовые почки. Эта жидкость частично продуцируется железами между вкусовыми почками. В результате сдвига мембранной проводимости в сенсорной клетке возникает рецепторный потенциал, и высвобождается возбуждающий нейромедиатор, под влиянием которого в первичном афферентном волокне развивается генераторный потенциал и начинается импульсный разряд, передаваемый в ЦНС.

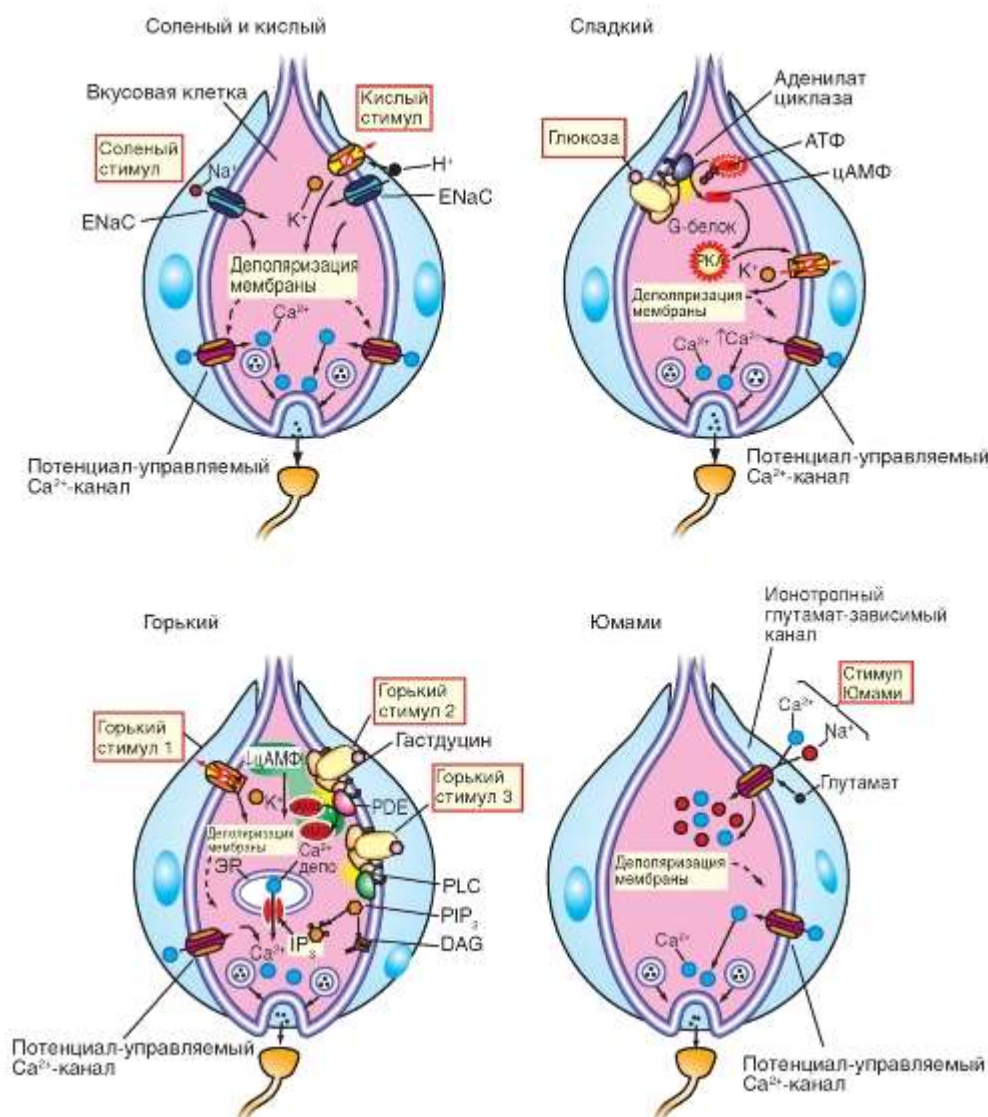
Кодирование четырех первичных вкусовых качеств не основывается на полной избирательности сенсорных клеток. Каждая клетка отвечает на стимулы более чем одного вкусового качества, однако наиболее активно, как правило, только на одно. Различение вкусового качества зависит от пространственно упорядоченного входа от популяции сенсорных клеток. Интенсивность стимула кодируется количественными характеристиками вызванной им активности (частотой импульсов и количеством возбужденных нервных волокон).

На рис. 5-11 показан механизм работы вкусовых почек, включающийся на разные по вкусу вещества.

Клеточные механизмы восприятия вкуса сводятся к различным способам деполяризации мембраны клетки и дальнейшему открытию потенциал управляемых кальциевых каналов. Вошедший кальций делает возможным освобождение медиатора, что приводит к появлению генераторного потенциала в окончании чувствительного нерва. Каждый стимул деполяризует мембрану разными путями. Солёный стимул взаимодействует с эпителиальными натриевыми каналами (ENaC), открывая их для натрия. Кислый стимул может самостоятельно открыть ENaC или же благодаря снижению pH закрыть калиевые каналы, что также приведет к деполяризации мембраны вкусовой клетки. Сладкий вкус возникает за счет взаимодействия сладкого стимула с чувствительным к нему рецептором, связанным с G-белком. Активированный G-белок стимулирует аденилатциклазу, которая повышает содержание цАМФ и далее активирует зависимую протеинкиназу, которая, в свою очередь, фосфорилируя калиевые каналы, закрывает их. Все это также приводит к деполяризации мембраны. Горький стимул может деполяризовать мембрану тремя путями: (1) закрытием калиевых каналов, (2) путем взаимодействия с G-белком (гаструцином) активировать фосфодиэстеразу (PDE), тем самым, снижая содержание цАМФ. Это (по не совсем понятным причинам) вызывает деполяризацию мембраны. (3) Горький стимул связывается с G-белком, способным активировать фосфолипазу C (PLC), в результате увеличивается содержание инозитол 1,4,5 трифосфат (IP₃), который приводит к освобождению кальция из депо.

Глутамат связывается с глутаматрегулируемыми неселективными ионными каналами и открывает их. Это сопровождается деполяризацией и открытием потенциал управляемых кальциевых каналов. (PIP₂) - фосфатидил инозитол 4,5бифосфат (DAG) - диацилглицерол

Рис. 5-11. Клеточные механизмы восприятия вкуса



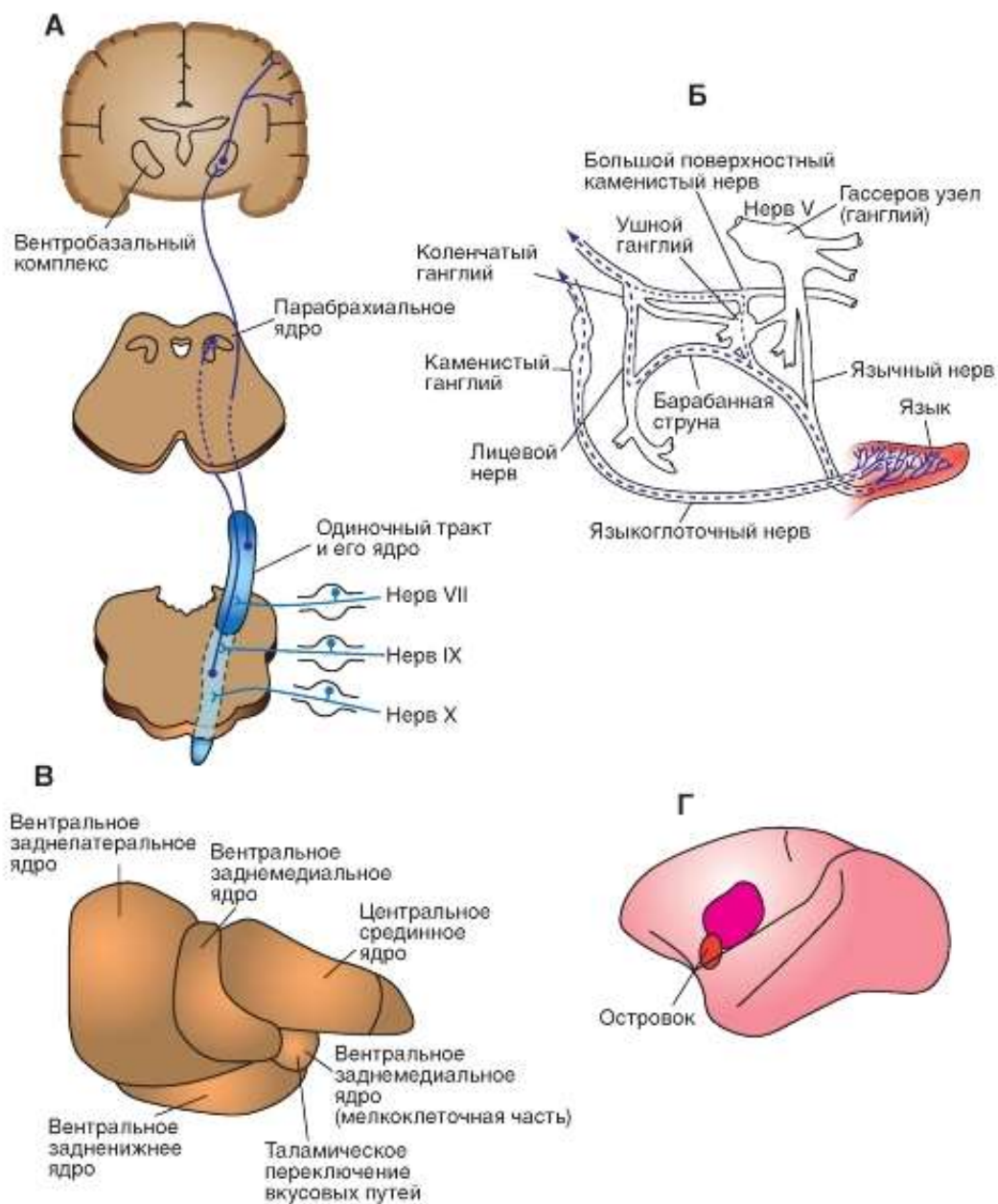
Центральные вкусовые пути

Тела клеток, которым принадлежат вкусовые волокна VII, IX и X черепных нервов, находятся соответственно в коленчатом, каменистом и узловатом ганглиях (рис. 5-12 Б). Центральные отростки их афферентных волокон входят в продолговатый мозг, включаются в состав одиночного тракта и оканчиваются синапсами в ядре одиночного тракта (*nucleus solitarius*) (рис. 5-12 А). У ряда животных, в том числе некоторых видов грызунов, вторичные вкусовые нейроны ядра одиночного тракта проецируются рострально к ипсилатеральному парабрахияльному ядру.

В свою очередь, парабрахияльное ядро посылает проекции к мелкоклеточной (правоцеллюлярной) части вентрального заднемедиального (ВЗМ_{МК}) ядра (МК - мелкоклеточная часть ВЗМ) таламуса (рис. 5-12 В). У обезьян проекции ядра одиночного тракта к ВЗМ_{МК}-ядру являются прямыми. ВЗМ_{МК}-ядро связано с двумя разными вкусовыми областями коры мозга. Одна из них - часть лицевого представительства (SI), другая находится в островковой доле (*insula* - островок) (рис. 5-12 Г). Центральный вкусовой путь необычен в том отношении, что его волокна не переходят на другую сторону мозга (в отличие от соматосенсорных, зрительных и слуховых путей).

Рис. 5-12. Пути проводящие вкусовую чувствительность.

А - окончание вкусовых афферентных волокон в ядре одиночного тракта и восходящие пути к парабрахияльному ядру, вентробазальному таламусу и коре большого мозга. Б - периферическое распределение вкусовых афферентных волокон. В и Г - вкусовые области таламуса и коры большого мозга обезьян



Обоняние

У приматов и человека (микросматов) обонятельная чувствительность развита гораздо хуже, чем у большинства животных (макросматов). Поистине легендарна способность собак находить след по запаху, также как привлечение насекомыми особей другого пола с помощью феромонов. Что касается человека, то у него обоняние играет роль в эмоциональной сфере; запахи эффективно способствуют извлечению информации из памяти.

Обонятельные рецепторы

Обонятельный хеморецептор (сенсорная клетка) - это биполярный нейрон (рис. 5-13 В). Его апикальная поверхность несет неподвижные реснички, реагирующие на пахучие вещества, растворенные в покрывающем их слое слизи. От более глубоко расположенного края клетки отходит немиелинизированный аксон. Аксоны объединяются в обонятельные пучки (*fila olfactoria*), проникающие в череп через отверстия в решетчатой пластинке (*lamina cribrosa*) решетчатой кости (*os ethmoidale*). Волокна обонятельного нерва оканчиваются синапсами в обонятельной луковице, а центральные обонятельные структуры находятся в основании черепа сразу под лобной долей. Обонятельные рецепторные клетки входят в состав слизистой оболочки специализированной обонятельной зоны носоглотки, общая поверхность которой с двух сторон составляет примерно 10 см² (рис. 5-13 А). У человека около 10⁷ обонятельных рецепторов. Так же как вкусовые рецепторы, обонятельные рецепторы имеют короткую продолжительность жизни (около 60 дней) и непрерывно замещаются.

Молекулы пахучих веществ попадают к обонятельной зоне через ноздри при вдохе или из ротовой полости во время еды. Нюхательные движения усиливают поступление этих веществ, временно соединяющихся с обонятельным связывающим белком слизи, секретлируемой железами слизистой оболочки носовой полости.

Первичных обонятельных ощущений больше, чем вкусовых. Насчитываются запахи, по крайней мере, шести классов: цветочный, эфирный (фруктовый), мускусный, камфарный, гнилостный и едкий. Примерами их природных источников могут служить соответственно роза, груша, мускус, эвкалипт, тухлые яйца и уксус. В обонятельной слизистой оболочке еще находятся рецепторы тройничного нерва. При клиническом тестировании обоняния следует избегать болевых или температурных раздражений этих соматосенсорных рецепторов.

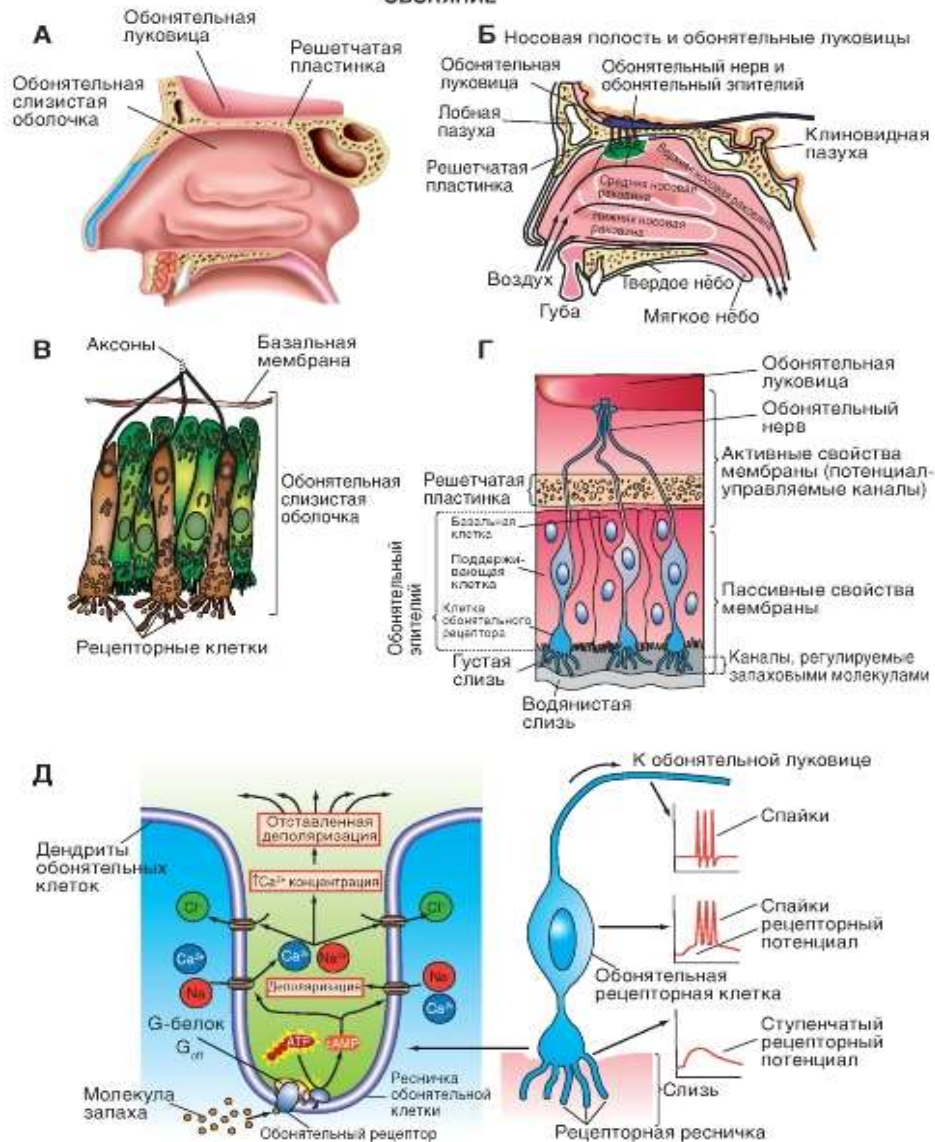
Несколько молекул пахучего вещества вызывают в сенсорной клетке деполяризующий рецепторный потенциал, запускающий разряд импульсов в афферентном нервном волокне. Однако для поведенческой реакции необходима активация некоторого числа обонятельных рецепторов. Рецепторный потенциал, по-видимому, возникает в результате повышения проводимости для Na⁺. Вместе с тем активируется G-белок. Следовательно, в обонятельном преобразовании (трансдукции) участвует каскад вторичных посредников.

Обонятельное кодирование имеет много общего с вкусовым. Каждый обонятельный хеморецептор отвечает на запахи более чем одного класса. Кодирование конкретного качества запаха обеспечивается ответами многих обонятельных рецепторов, а интенсивность ощущения определяется количественными характеристиками импульсной активности.

Рис. 5-13. Химическая чувствительность - обоняние и его основы.

АиБ - схема расположения обонятельной зоны слизистой оболочки в носоглотке. Вверху находится решетчатая пластинка, а над ней - обонятельная луковица. Обонятельная слизистая оболочка распространяется и на боковые стороны носоглотки. В и Г - обонятельные хеморецепторы и поддерживающие клетки. Г - обонятельный эпителий. Д - схема процессов в обонятельных рецепторах

ОБОНЯНИЕ



Центральные обонятельные пути

Обонятельный путь первый раз переключается в обонятельной луковице, относящейся к коре мозга. Эта структура содержит клетки трех типов: митральные клетки, пучковатые клетки и интернейроны (клетки-зерна, перигломерулярные клетки) (рис. 5-14). Длинные разветвляющиеся дендриты митральных и пучковатых клеток образуют постсинаптические компоненты обонятельных гломерул (клубочков). Обонятельные афферентные волокна (идущие от обонятельной слизистой оболочки к обонятельной луковице) ветвятся около обонятельных клубочков и оканчиваются синапсами на дендритах митральных и пучковатых клеток. При этом происходит значительная конвергенция обонятельных аксонов на дендритах митральных клеток: на дендрите каждой митральной клетки находится до 1000 синапсов афферентных волокон. Клетки-зерна (гранулярные клетки) и перигломерулярные клетки - это тормозные интернейроны. Они образуют реципрокные дендродендритные синапсы с митральными клетками. При активации митральных клеток происходит деполяризация контактирующих с ней интернейронов, вследствие чего в их синапсах на митральных клетках высвобождается тормозной нейромедиатор. Обонятельная луковица получает входы не только через ипсилатеральные обонятельные нервы, но и через контралатеральный обонятельный тракт, идущий в передней комиссуре (спайке).

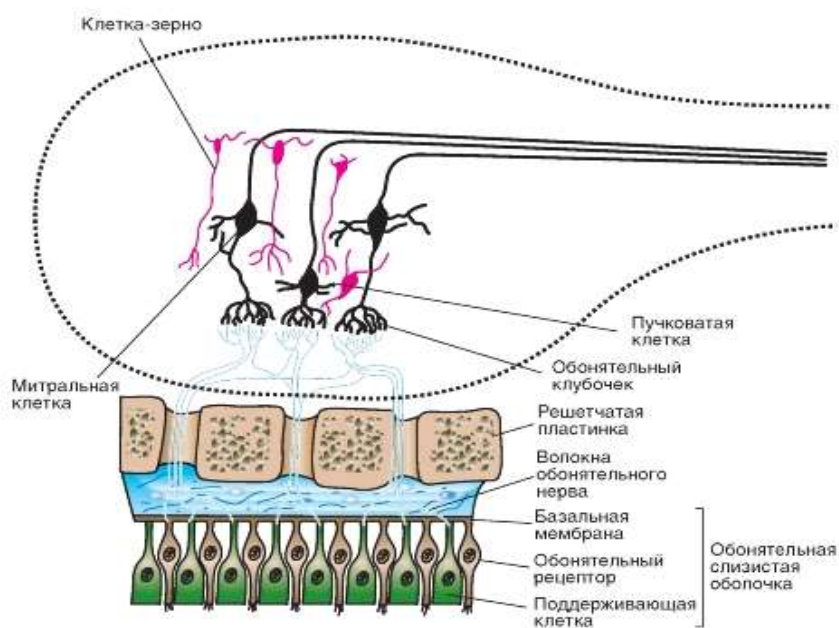
Аксоны митральных и пучковатых клеток покидают обонятельную луковицу и входят в состав обонятельного тракта (рис. 5-14). Начиная с этого участка, обонятельные связи очень усложняются. Обонятельный тракт идет через переднее обонятельное ядро. Нейроны этого ядра получают синаптические связи от нейронов обонятельной луковицы и проецируются через переднюю комиссуру к контралатеральной обонятельной луковице. Подойдя к переднему продырявленному веществу на основании мозга, обонятельный тракт разделяется на латеральную и медиальную обонятельные полоски. Аксоны латеральной обонятельной полоски оканчиваются синапсами в первичной обонятельной области, включая пре-грушевидную (препириформную) область коры, а у животных - грушевидную (пириформную) долю. Медиальная обонятельная полоска дает проекции к миндалине и к коре базального переднего мозга.

Следует отметить, что обонятельный путь это единственная сенсорная система без обязательного синаптического переключения в таламусе. Вероятно, отсутствие такого переключения отражает филогенетическую древность и относительную примитивность обонятельной системы. Однако обонятельная информация все же поступает в заднемедиальное ядро таламуса и оттуда направляется в префронтальную и орбитофронтальную кору.

При стандартном неврологическом исследовании проверку обоняния обычно не производят. Однако восприятие запахов можно тестировать, предложив испытуемому понюхать и идентифицировать пахучее вещество. Одновременно исследуют одну ноздрю, другую нужно закрыть. При этом нельзя применять такие сильные стимулы, как нашатырь, поскольку они активируют и окончания тройничного нерва. Нарушение обоняния (аносмия) наблюдается, когда повреждено основание черепа или же одна или обе обонятельные луковицы сдавлены опухолью (например, при менингиоме обонятельной ямки). Аура неприятного запаха, часто запаха жженой резины, возникает при эпилептических припадках, генерируемых в области ункуса.

Рис. 5-14. Схема сагиттального среза через обонятельную луковицу, показывающая окончания обонятельных хеморецепторных клеток на обонятельных клубочках и на нейронах обонятельной луковицы.

Аксоны митральных и пучковатых клеток выходят в составе обонятельного тракта (направо)



Строение глаза

Стенка глаза состоит из трех концентрических слоев (оболочек) (рис. 5-15 А). Наружный опорный слой, или фиброзная оболочка, включает в себя прозрачную роговицу с ее эпителием, конъюнктиву и непрозрачную склеру. В среднем слое, или сосудистой оболочке, находятся радужная оболочка (радужка) и собственно сосудистая оболочка (*choroidea*). В радужной оболочке присутствуют радиальные и кольцевые гладкие мышечные волокна, образующие дилататор и сфинктер зрачка (рис. 5-15 Б). Сосудистая оболочка (хороид) богата снабжена кровеносными сосудами, питающими внешние слои сетчатки, а также содержит пигмент. Внутренний нервный слой стенки глаза, или сетчатка, содержит палочки и колбочки и выстилает всю внутреннюю поверхность глаза, за исключением «слепого пятна» - диска зрительного нерва (рис. 5-15 А). К диску сходятся аксоны ганглиозных клеток сетчатки, образуя зрительный нерв. Наиболее высокая острота зрения в центральной части сетчатки, так называемом желтом пятне (*macula lutea*). Середина желтого пятна вдавлена в виде центральной ямки (*fovea centralis*) - зоны фокусирования зрительных изображений. Внутренняя часть сетчатки питается за счет ветвей ее центральных сосудов (артерий и вен), которые входят вместе со зрительным нервом, затем в области диска разветвляются и расходятся по внутренней поверхности сетчатки (рис. 5-15 В), не задевая желтое пятно.

Кроме сетчатки, в глазу есть и другие образования: хрусталик - линза, фокусирующая свет на сетчатке; пигментный слой, ограничивающий рассеяние света; водянистая влага и стекловидное тело. Водянистая влага - это жидкость, составляющая среду передней и задней камер глаза, а стекловидное тело заполняет внутреннее пространство глаза за хрусталиком. Оба вещества способствуют поддержанию формы глаза. Водянистая влага секретируется ресничным эпителием задней камеры, затем циркулирует через зрачок в переднюю камеру, а оттуда попадает через шлеммов канал в венозный кровоток (рис. 5-15 Б). От давления водянистой влаги (в норме оно ниже 22 мм рт.ст.) зависит внутриглазное давление, которое не должно превышать 22 мм рт.ст. Стекловидное тело - это гель, состоящий из внеклеточной жидкости с коллагеном и гиалуроновой кислотой; в отличие от водянистой влаги, оно заменяется очень медленно.

Если поглощение водянистой влаги нарушается, внутриглазное давление возрастает и развивается глаукома. При повышении внутриглазного давления затрудняется кровоснабжение сетчатки и глаз может ослепнуть.

Ряд функций глаза зависит от деятельности мышц. Наружные глазные мышцы, прикрепленные вне глаза, направляют движения глазных яблок к зрительной мишени. Эти мышцы иннервируются глазодвигательным (*nervus oculomotorius*), блоковым (*n. trochlearis*) и отводящим (*n. abducens*) нервами. Есть также внутренние глазные мышцы. Благодаря мышце, расширяющей зрачок (дилататор зрачка), и мышце, суживающей зрачок (сфинктер зрачка), радужка действует как диафрагма и регулирует диаметр зрачка аналогично устройству отверстия фотокамеры, контролирующему количество входящего света. Дилататор зрачка активируется симпатической нервной системой, а сфинктер - парасимпатической нервной системой (через систему глазодвигательного нерва).

Форма хрусталика тоже определяется работой мышц. Хрусталик подвешен и удерживается на своем месте позади радужки с помощью волокон цилиарного (ресничного, или циннова) пояса, прикрепленных к капсуле зрачка и к цилиарному телу. Хрусталик окружен волокнами цилиарной мышцы, действующей как сфинктер. Когда эти волокна расслаблены, натяжение волокон пояса растягивает хрусталик, уплощая его. Сокращаясь, цилиарная мышца противодействует натяжению волокон пояса, что позволяет эластичному хрусталику принять более выпуклую форму. Цилиарная мышца активируется парасимпатической нервной системой (через систему глазодвигательного нерва).

Рис. 5-15. Зрение.

А - схема горизонтального сечения правого глаза. Б - строение передней части глаза в области лимба (соединения роговицы и склеры), цилиарного тела и хрусталика. В - задняя поверхность (дно) глаза человека; вид в офтальмоскоп. Ветви центральной артерии и вены выходят из области диска зрительного нерва. Недалеко от диска зрительного нерва с височной его стороны находится центральная ямка (ЦЯ). Обратите внимание на распределение аксонов ганглиозных клеток (тонкие линии), сходящихся в диске зрительного нерва.

На дальнейших рисунках дана детализация строения глаза и механизмов работы его структур (пояснения на рисунках)

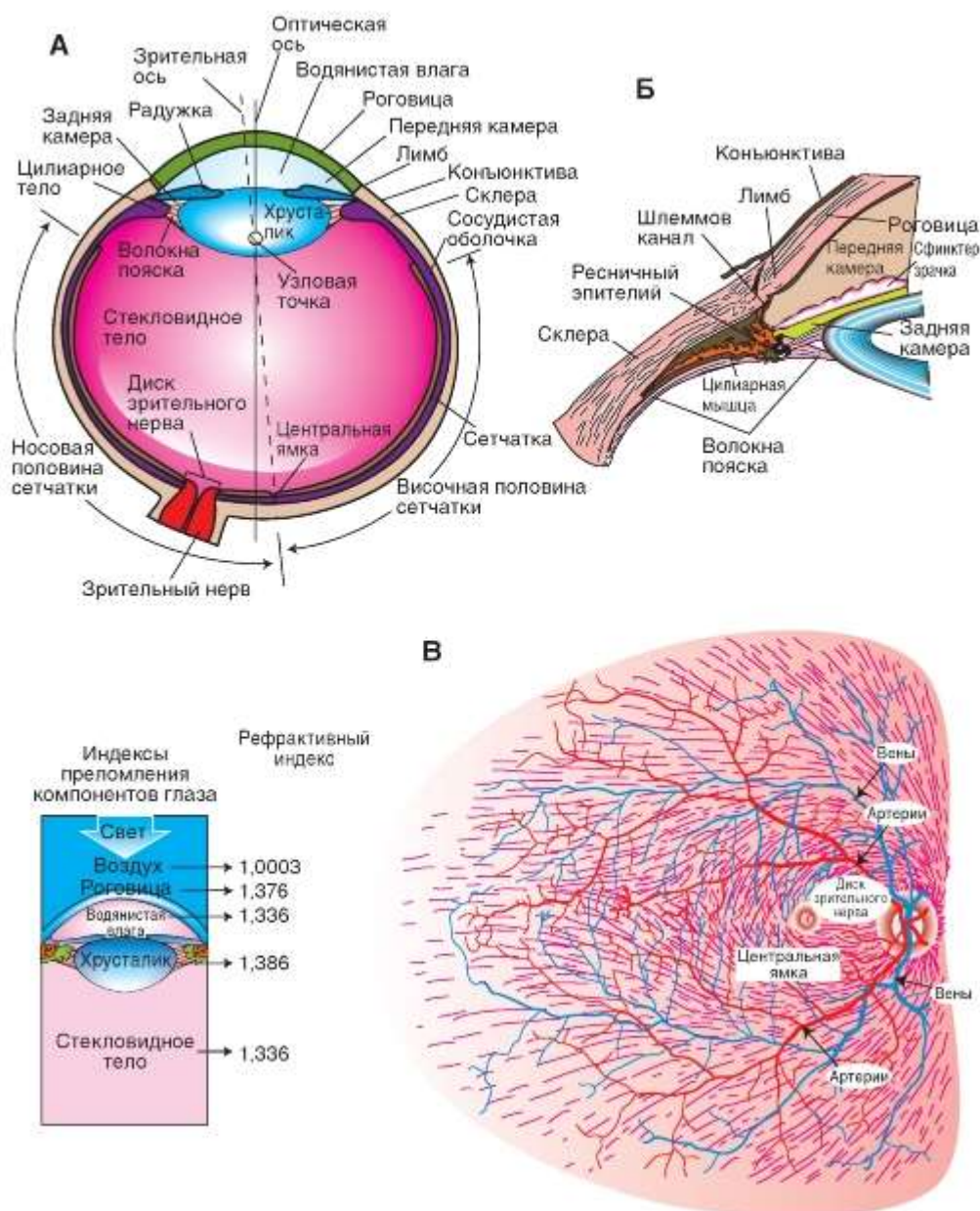
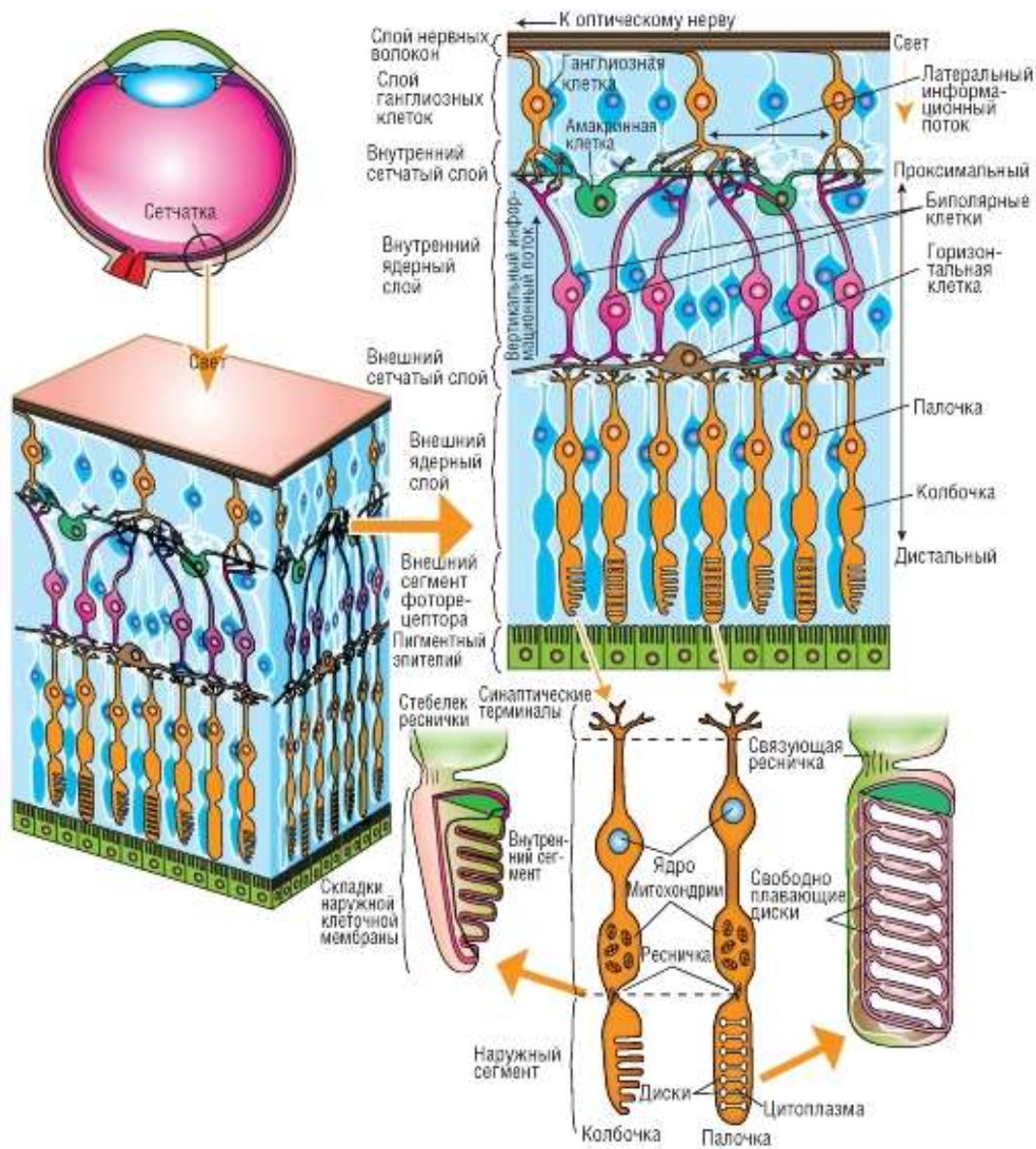


Рис. 5-15.2.



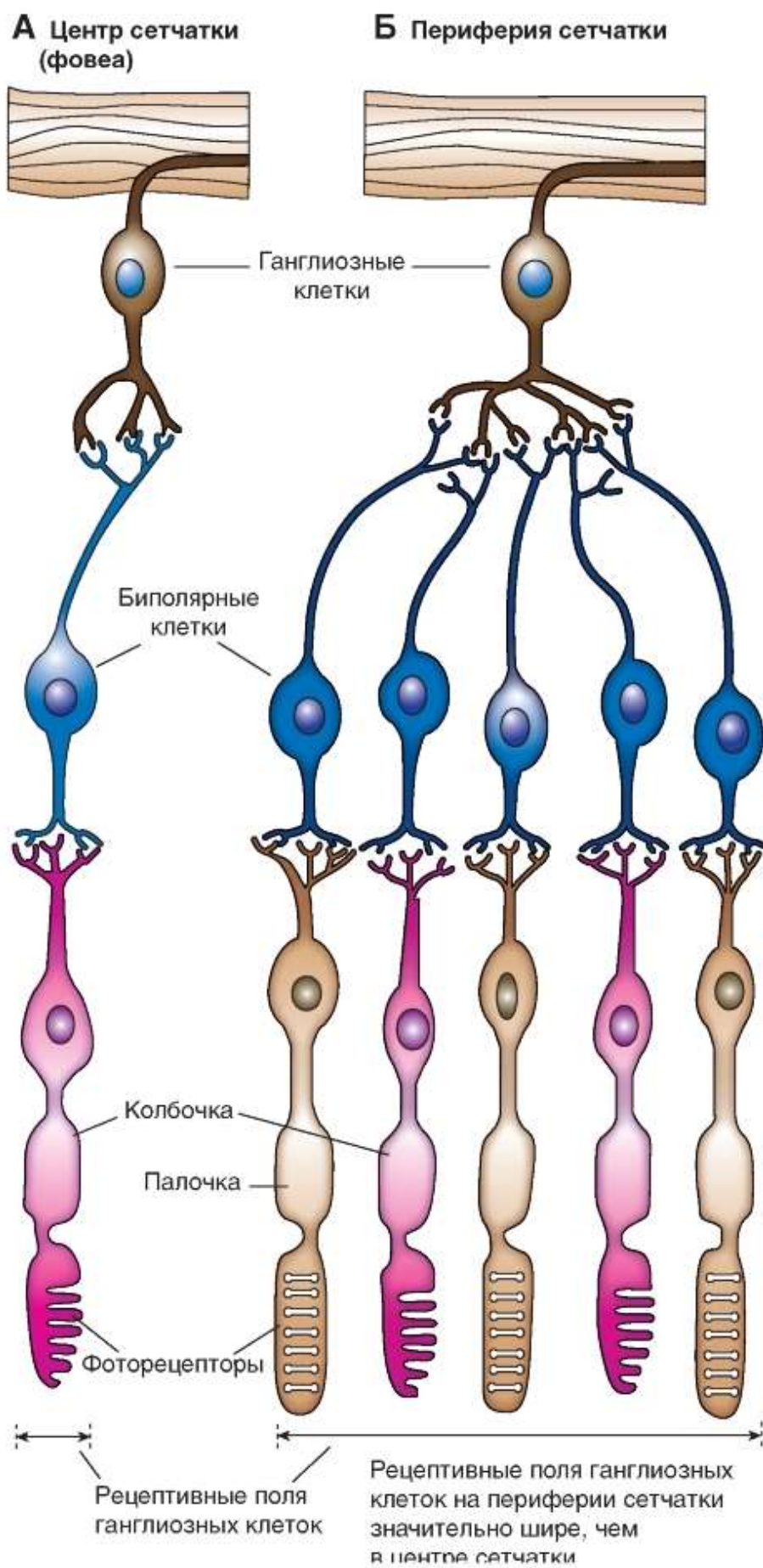


Рис. 5-15.3.

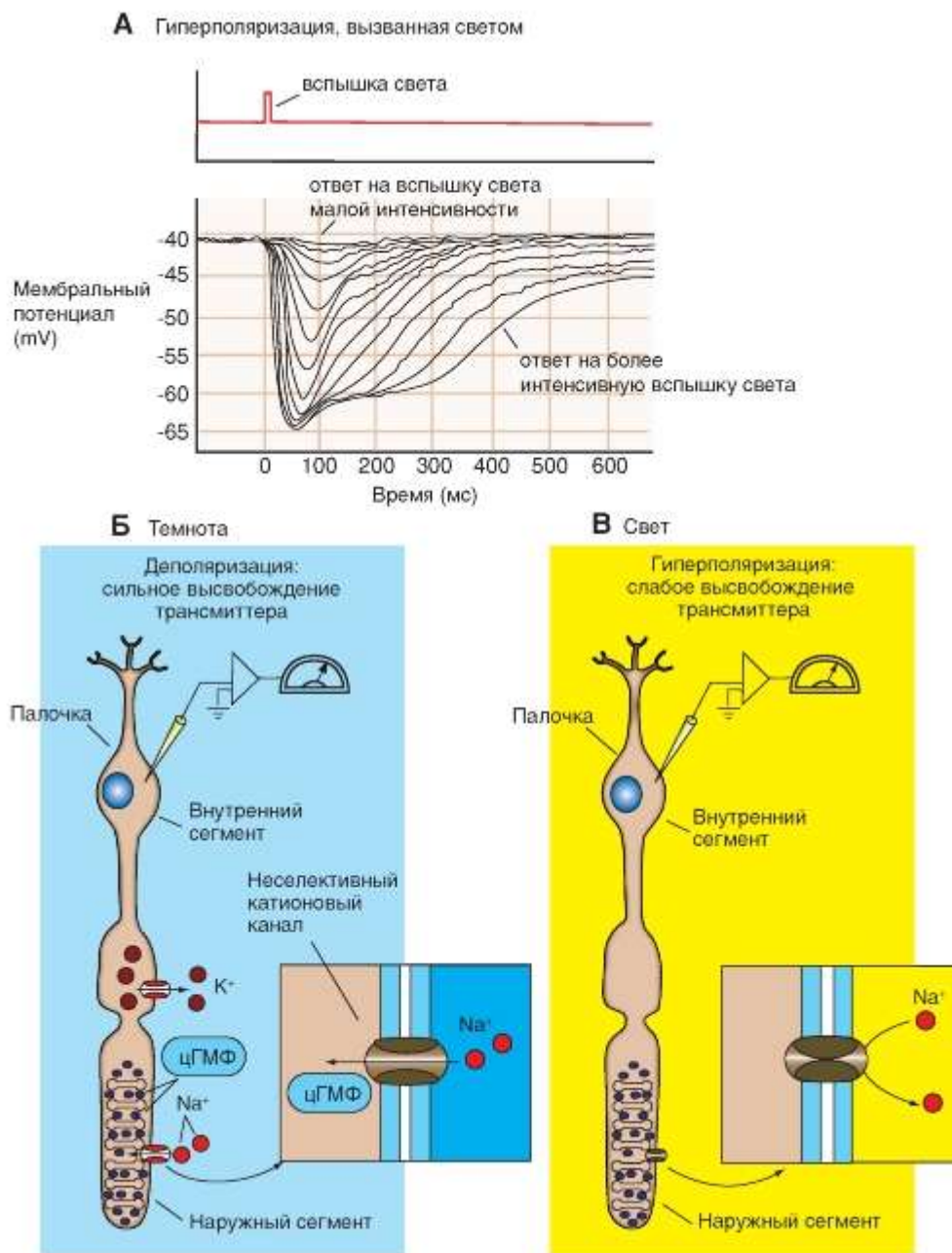


Рис. 5-15.4.

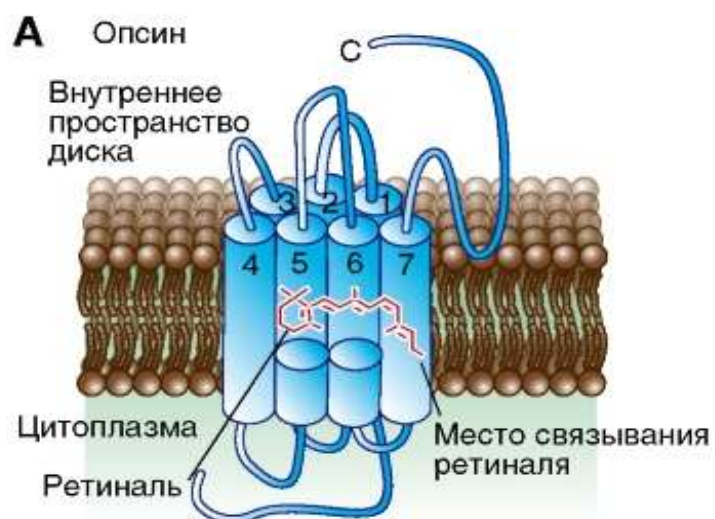


Рис. 5-15.5.

Оптическая система глаза

Свет входит в глаз через роговицу и проходит через последовательно расположенные прозрачные жидкости и структуры: роговицу, водянистую влагу, хрусталик и стекловидное тело. Их совокупность называется диоптрическим аппаратом. В нормальных условиях происходит рефракция (преломление) лучей света от зрительной мишени роговицей и хрусталиком, так что лучи фокусируются на сетчатке. Преломляющая сила роговицы (основного рефракционного элемента глаза) равна 43 диоптриям * [«Д», диоптрия, - единица преломляющей (оптической) силы, равная обратной величине фокусного расстояния линзы (хрусталика), заданного в метрах]. Выпуклость хрусталика может изменяться, и его преломляющая сила варьирует между 13 и 26 Д. Благодаря этому хрусталик обеспечивает аккомодацию глазного яблока к объектам, находящимся на близком или на далеком расстоянии. Когда, например, лучи света от удаленного объекта входят в нормальный глаз (с расслабленной цилиарной мышцей), мишень оказывается в фокусе на сетчатке. Если же глаз направлен на ближний объект, лучи света сначала фокусируются позади сетчатки (т.е. изображение на сетчатке расплывается), пока не произойдет аккомодация. Цилиарная мышца сокращается, ослабляя натяжение волокон пояса, кривизна хрусталика увеличивается, и в результате изображение фокусируется на сетчатке.

Роговица и хрусталик вместе составляют выпуклую линзу. Лучи света от объекта проходят через узловую точку линзы и образуют на сетчатке перевернутое изображение, как в фотоаппарате. Сетчатка обрабатывает непрерывную последовательность изображений, а также посылает в мозг сообщения о перемещениях зрительных объектов, угрожающих признаках, периодической смене света и темноты и другие зрительные данные о внешней среде.

Хотя оптическая ось человеческого глаза проходит через узловую точку хрусталика и через точку сетчатки между центральной ямкой и диском зрительного нерва, глазодвигательная система ориентирует глазное яблоко на участок объекта, называемый точкой фиксации. От этой точки луч света идет через узловую точку и фокусируется в центральной ямке. Таким образом луч проходит вдоль зрительной оси. Лучи от остальных участков объекта фокусируются в области сетчатки вокруг центральной ямки (рис. 5-16 А).

Фокусирование лучей на сетчатке зависит не только от хрусталика, но и от радужки. Радужка играет роль диафрагмы фотоаппарата и регулирует не только количество света, поступающего в глаз, но, что еще важнее, глубину зрительного поля и сферическую aberrацию хрусталика. При уменьшении диаметра зрачка глубина зрительного поля возрастает, и лучи света направляются через центральную часть зрачка, где сферическая aberrация минимальна. Изменения диаметра зрачка происходят автоматически, т.е. рефлекторно, при настройке (аккомодации) глаза на рассматривание близких предметов. Следовательно, во время чтения или другой деятельности глаз, связанной с различением мелких объектов, качество изображения улучшается с помощью оптической системы глаза. На качество изображения влияет еще один фактор - рассеяние света. Оно минимизируется путем ограничения пучка света, а также его поглощения пигментом сосудистой оболочки и пигментным слоем сетчатки. В этом отношении глаз снова напоминает фотоаппарат. Там рассеяние света тоже предотвращается посредством ограничения пучка лучей и его поглощения черной краской, покрывающей внутреннюю поверхность камеры.

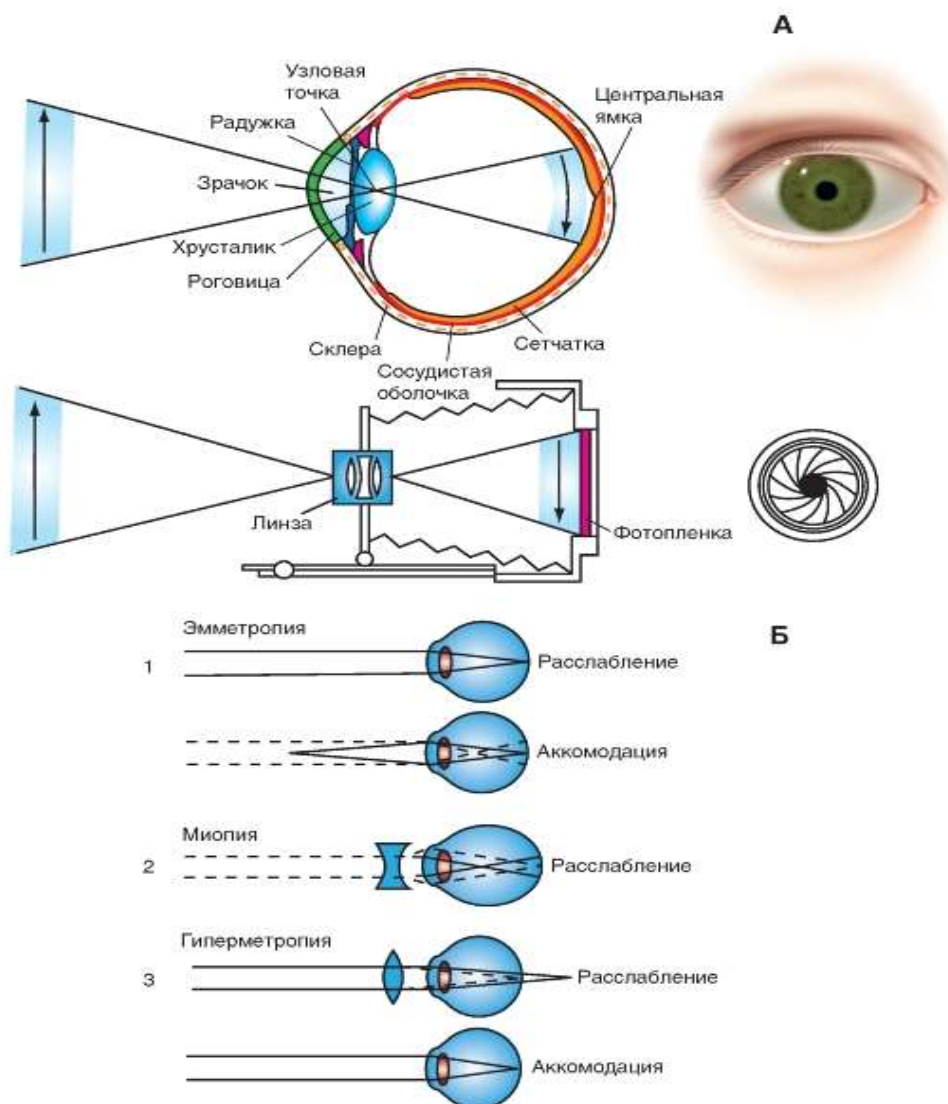
Фокусирование изображения нарушается, если размер глаза не соответствует преломляющей силе диоптрического аппарата. При миопии (близорукости) изображения удаленных объектов фокусируются впереди сетчатки, не доходя до нее (рис. 5-16 Б). Дефект корректируется с помощью вогнутых линз. И наоборот, при гиперметропии (дальнозоркости) изображения далеких предметов фокусируются

позади сетчатки. Чтобы устранить проблему, нужны выпуклые линзы (рис. 5-16 Б). Правда, изображение можно временно сфокусировать за счет аккомодации, но при этом утомляются цилиарные мышцы и глаза устают. При астигматизме существует асимметрия между радиусами кривизны поверхностей роговицы или хрусталика (а иногда сетчатки) в разных плоскостях. Для коррекции применяют линзы со специально подобранными радиусами кривизны.

Упругость хрусталика постепенно снижается с возрастом. В результате падает эффективность его аккомодации при рассматривании близких предметов (пресбиопия). В молодом возрасте преломляющая сила хрусталика может меняться в широком диапазоне, вплоть до 14 Д. К 40 годам этот диапазон уменьшается вдвое, а после 50 лет падает до 2 Д и ниже. Пресбиопия корректируется выпуклыми линзами.

Рис. 5-16. Оптическая система глаза.

А - сходство между оптическими системами глаза и фотоаппарата. Б - аккомодация и ее нарушения: 1 - эметропия - нормальная аккомодация глаза. Лучи света от удаленного зрительного объекта фокусируются на сетчатке (верхняя схема), а фокусирование лучей от близкого объекта происходит в результате аккомодации (нижняя схема); 2 - миопия; изображение удаленного зрительного объекта фокусируется впереди сетчатки, для коррекции нужны вогнутые линзы; 3 - гиперметропия; изображение фокусируется позади сетчатки (верхняя схема), для коррекции требуются выпуклые линзы (нижняя схема)



Орган слуха

Периферический слуховой аппарат, ухо, подразделяется на наружное, среднее и внутреннее ухо (рис. 5-17 А). Наружное ухо

Наружное ухо состоит из ушной раковины, наружного слухового прохода и слухового канала. Церуминозные железы стенок слухового канала секретируют ушную серу - воскообразное защитное вещество. Ушная раковина (по крайней мере, у животных) направляет звук в слуховой канал. По слуховому каналу звук передается к барабанной перепонке. У человека слуховой канал имеет резонансную частоту примерно 3500 Гц и ограничивает частоту звуков, достигающих барабанной перепонки.

Среднее ухо

Наружное ухо отделено от среднего барабанной перепонкой (рис. 5-17 Б). Среднее ухо заполнено воздухом. Цепочка косточек соединяет барабанную перепонку с овальным окном, открывающимся во внутреннее ухо. Недалеко от овального окна расположено круглое окно, тоже соединяющее среднее ухо с внутренним (рис. 5-17 В). Оба отверстия затянуты мембраной. Цепочка слуховых косточек включает молоточек (*malleus*), наковальню (*incus*) и стремя (*stapes*). Основание стремени в виде пластинки плотно входит в овальное окно. За овальным окном находится заполненное жидкостью преддверие (*vestibulum*) - часть улитки (*cochlea*) внутреннего уха. Преддверие составляет единое целое с трубчатой структурой - лестницей преддверия (*scala vestibuli* - вестибулярная лестница). Колебания барабанной перепонки, вызываемые волнами звукового давления, передаются по цепочке косточек и толкают пластинку стремени в овальное окно (рис. 5-17 В). Движения пластинки стремени сопровождаются колебаниями жидкости в лестнице преддверия. Волны давления распространяются по жидкости и передаются через основную (базиллярную) мембрану улитки к барабанной лестнице (*scala tympani*) (см. ниже), заставляя перепонку круглого окна выпгибаться в сторону среднего уха.

Барабанная перепонка и цепочка слуховых косточек осуществляют согласование импеданса. Дело в том, что ухо должно различать звуковые волны, распространяющиеся в воздухе, тогда как механизм нервного преобразования звука зависит от перемещений столба жидкости в улитке. Следовательно, нужен переход от колебаний воздуха к колебаниям жидкости. Акустический импеданс воды гораздо выше, чем таковой воздуха, поэтому без специального устройства для согласования импедансов происходило бы отражение большей части звука, поступающего в ухо. Согласование импедансов в ухе зависит от:

- соотношения площадей поверхности барабанной перепонки и овального окна;
- механического преимущества рычажной конструкции в виде цепочки подвижно сочлененных косточек.

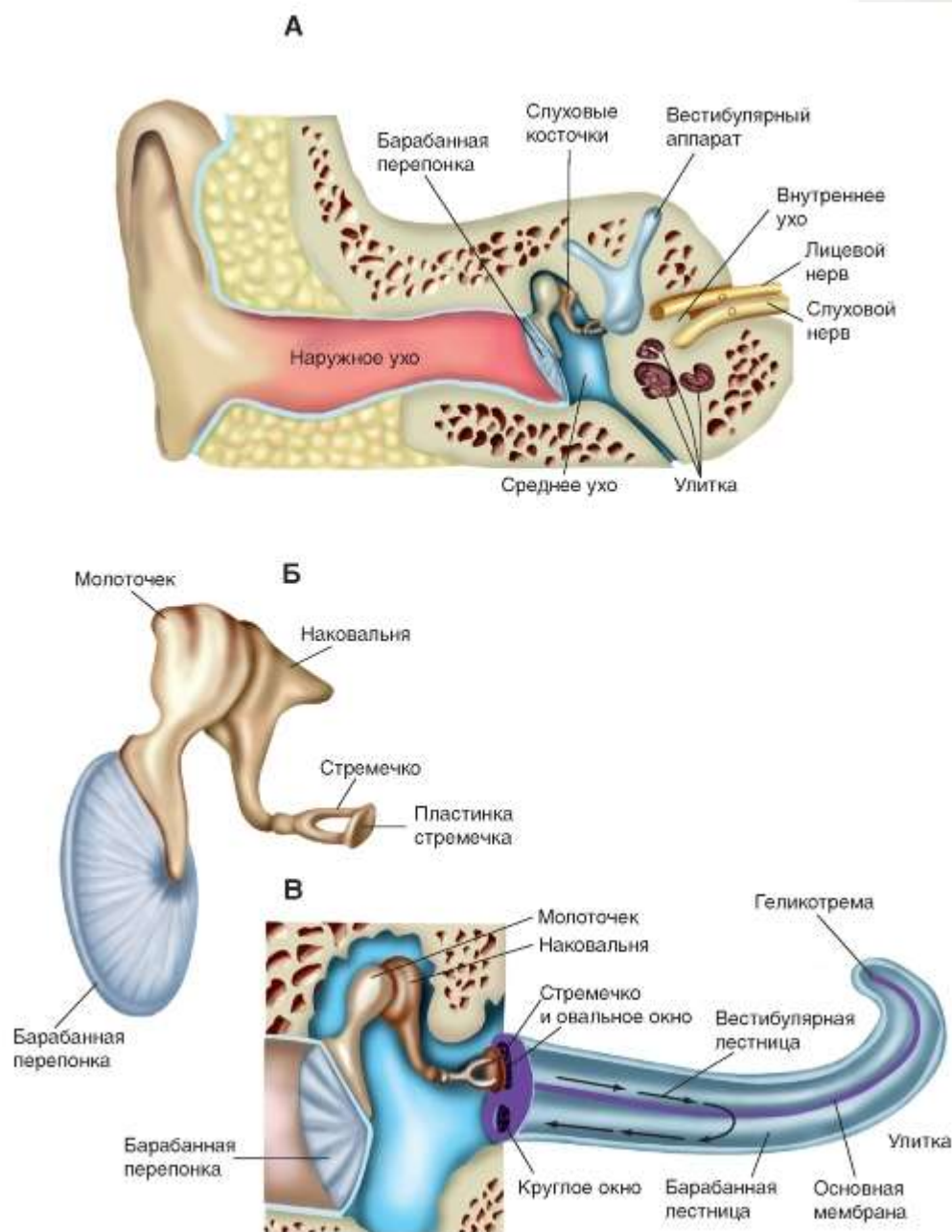
Эффективность механизма согласования импедансов соответствует улучшению слышимости на 10-20 дБ.

Среднее ухо выполняет и другие функции. В нем находятся две мышцы: мышца, напрягающая барабанную перепонку (*m. tensor tympani* - иннервируется тройничным нервом), и стремениная мышца (*m. stapedius* - иннервируется лицевым нервом). Первая прикреплена к молоточку, вторая - к стремени. Сокращаясь, они уменьшают перемещения слуховых косточек и снижают чувствительность акустического аппарата. Это способствует защите слуха от повреждающих звуков, но только если организм ожидает их. Внезапный взрыв может повредить акустический аппарат, поскольку рефлекторное сокращение мышц среднего уха запаздывает. Полость среднего уха соединена с глоткой посредством евстахиевой трубы. Благодаря этому проходу уравнивается давление в

наружном и среднем ухе. Если при воспалении в среднем ухе скапливается жидкость, просвет евстахиевой трубы может закрыться. Создающаяся при этом разность давлений между наружным и средним ухом вызывает боль из-за натяжения барабанной перепонки, возможен даже разрыв последней. Разность давлений может возникать в самолете и во время ныряния.

Рис. 5-17. Слух.

А - общая схема наружного, среднего и внутреннего уха. Б - схема барабанной перепонки и цепочки слуховых косточек. В - схема поясняет, каким образом при смещении овальной пластинки стремени происходит движение жидкости в улитке и выгибается круглое окно



Внутреннее ухо

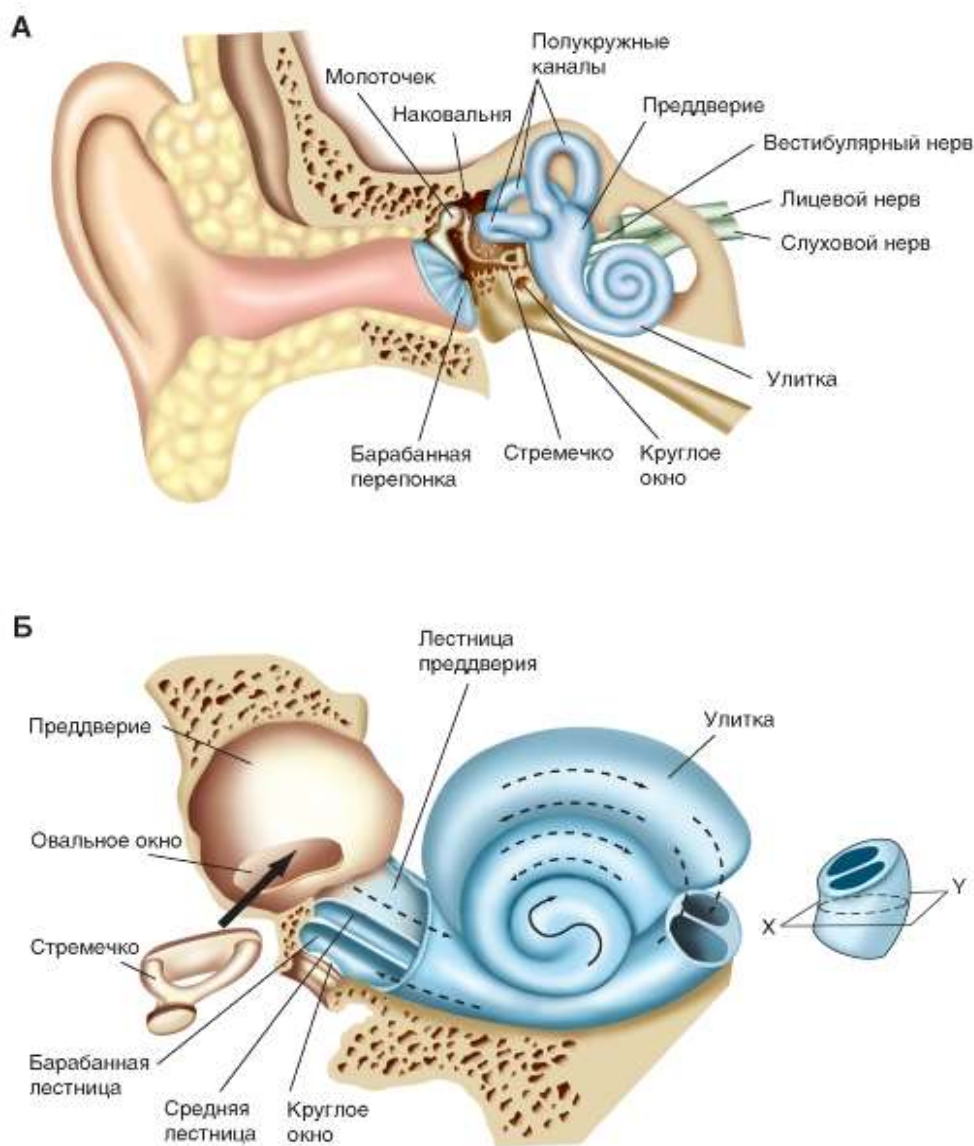
В состав внутреннего уха входят костный и перепончатый лабиринты. Они образуют улитку и вестибулярный аппарат.

Улитка - это трубка, закрученная в виде спирали. У человека спираль имеет $2\frac{1}{2}$ оборота; трубка начинается широким основанием и заканчивается суженной верхушкой. Улитка образована роstralным концом костного и перепончатого лабиринтов. У человека верхушка улитки расположена в латеральной плоскости (рис. 5-18 А).

Костный лабиринт (*labyrinthus osseus*) улитки включает в себя несколько камер. Пространство около овального окна называется преддверием (рис. 5-18 Б). Преддверие переходит в лестницу преддверия - спиральную трубку, которая продолжается к верхушке улитки. Там лестница преддверия соединяется через отверстие улитки (геликотрему) с барабанной лестницей; это еще одна спиральная трубка, которая спускается назад по улитке и заканчивается у круглого окна (рис. 5-18 Б). Центральный костный стержень, вокруг которого закручены спиральные лестницы, называется стержнем улитки (*modiolus cochleae*).

Рис. 5-18. Строение улитки.

А - относительное расположение улитки и вестибулярного аппарата среднего и наружного уха человека. Б - соотношение между пространствами улитки



Кортиев орган

Перепончатый лабиринт (*labyrinthus membranaceus*) улитки иначе называют средней лестницей (*scala media*) или улитковым протоком (*ductus cochlearis*). Это перепончатая сплюснутая спиральная трубка длиной 35 мм между лестницей преддверия и барабанной лестницей. Одна стенка средней лестницы образована базилярной мембраной, другая - рейснеровой мембраной, третья - сосудистой полоской (*stria vascularis*) (рис. 5-19 А).

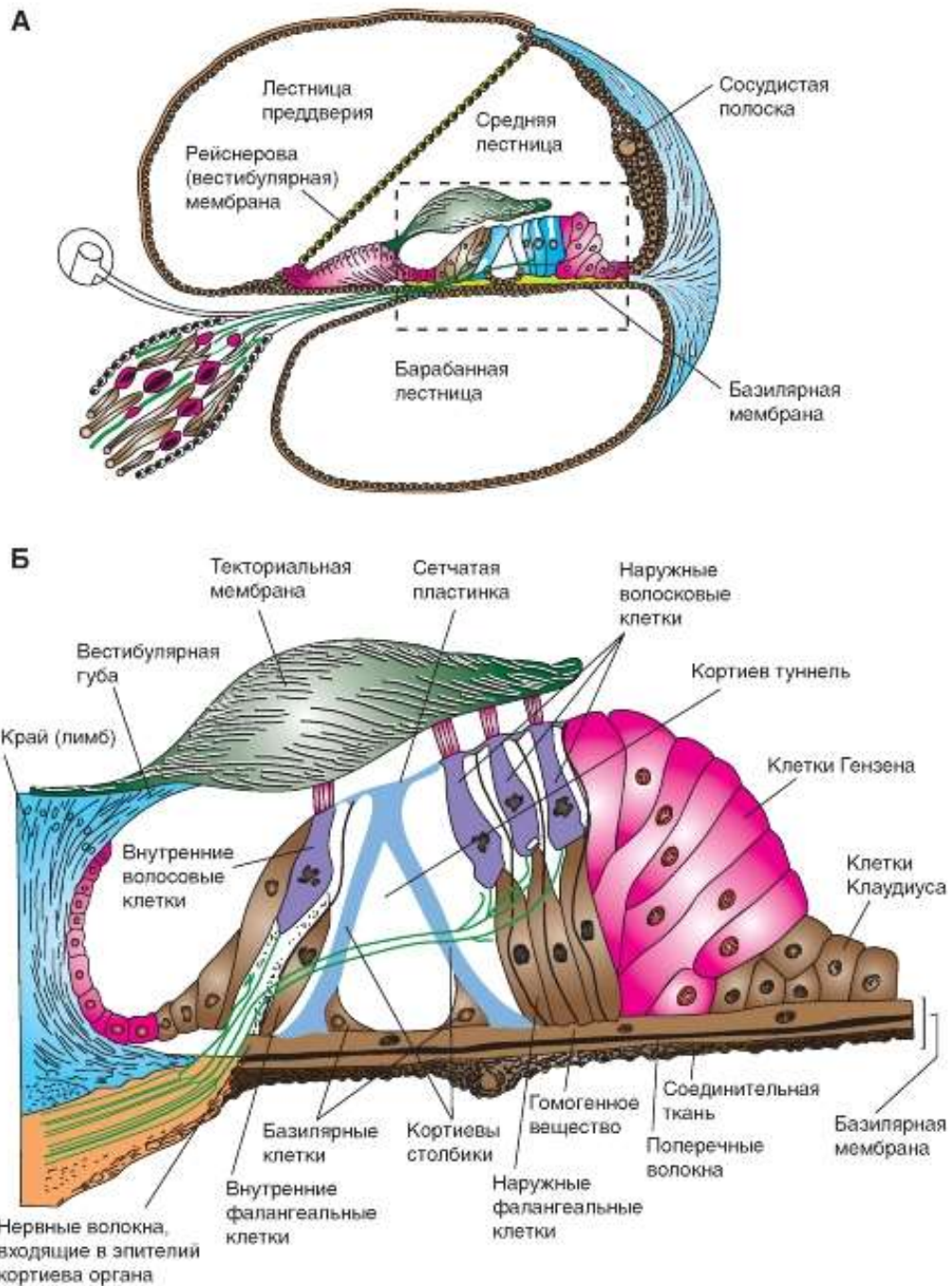
Улитка заполнена жидкостью. В лестнице преддверия и барабанной лестнице находится перилимфа, близкая по составу к ЦСЖ. Средняя лестница содержит эндолимфу, которая значительно отличается от ЦСЖ. В этой жидкости много K^+ (около 145 мМ) и мало Na^+ (около 2 мМ), так что она сходна с внутриклеточной средой. Поскольку эндолимфа обладает положительным зарядом (около +80 мВ), волосковые клетки внутри улитки имеют высокий трансмембранный градиент потенциала (около 140 мВ). Эндолимфу секретирует сосудистая полоска, а дренирование происходит через эндолимфатический проток в венозные синусы твердой мозговой оболочки.

Нервный аппарат преобразования звука носит название «кортиева органа» (рис. 5-19 Б). Он лежит на дне улиткового хода на базилярной мембране и состоит из нескольких компонентов: трех рядов наружных волосковых клеток, одного ряда внутренних волосковых клеток, желеобразной текториальной (покровной) мембраны и поддерживающих (опорных) клеток нескольких типов. В кортиевом органе человека 15 000 наружных и 3500 внутренних волосковых клеток. Опорную структуру кортиева органа составляют столбчатые клетки и ретикулярная пластинка (сетчатая мембрана). Из верхушек волосковых клеток выступают пучки стереоцилий - ресничек, погруженных в текториальную мембрану.

Кортиев орган иннервируют нервные волокна улитковой части восьмого черепного нерва. Эти волокна (у человека 32 000 слуховых афферентных аксонов) принадлежат сенсорным клеткам спирального ганглия, заключенного в центральном костном стержне. Афферентные волокна входят в кортиев орган и оканчиваются у оснований волосковых клеток (рис. 5-19 Б). Волокна, снабжающие наружные волосковые клетки, входят через кортиев туннель - отверстие под столбчатыми клетками.

Рис. 5-19. Улитка.

А - схема поперечного разреза через улитку в ракурсе, показанном на врезке рис. 5-20
Б. Б - строение кортиева органа



Преобразование (трансдукция) звука

Кортиев орган преобразует звук следующим образом. Достигая барабанной перепонки, звуковые волны вызывают ее колебания, которые передаются жидкости, заполняющей лестницу преддверия и барабанную лестницу (рис. 5-20 А). Гидравлическая энергия приводит к смещению базилярной мембраны, а вместе с ней и кортиева органа (рис. 5-20 Б). Сдвиговое усилие, развиваемое в результате смещения базилярной мембраны относительно текториальной мембраны, заставляет сгибаться стереоцилии волосковых клеток. Когда стереоцилии сгибаются в сторону самой длинной из них, волосковая клетка деполяризуется, когда они сгибаются в противоположную сторону - гиперполяризуется.

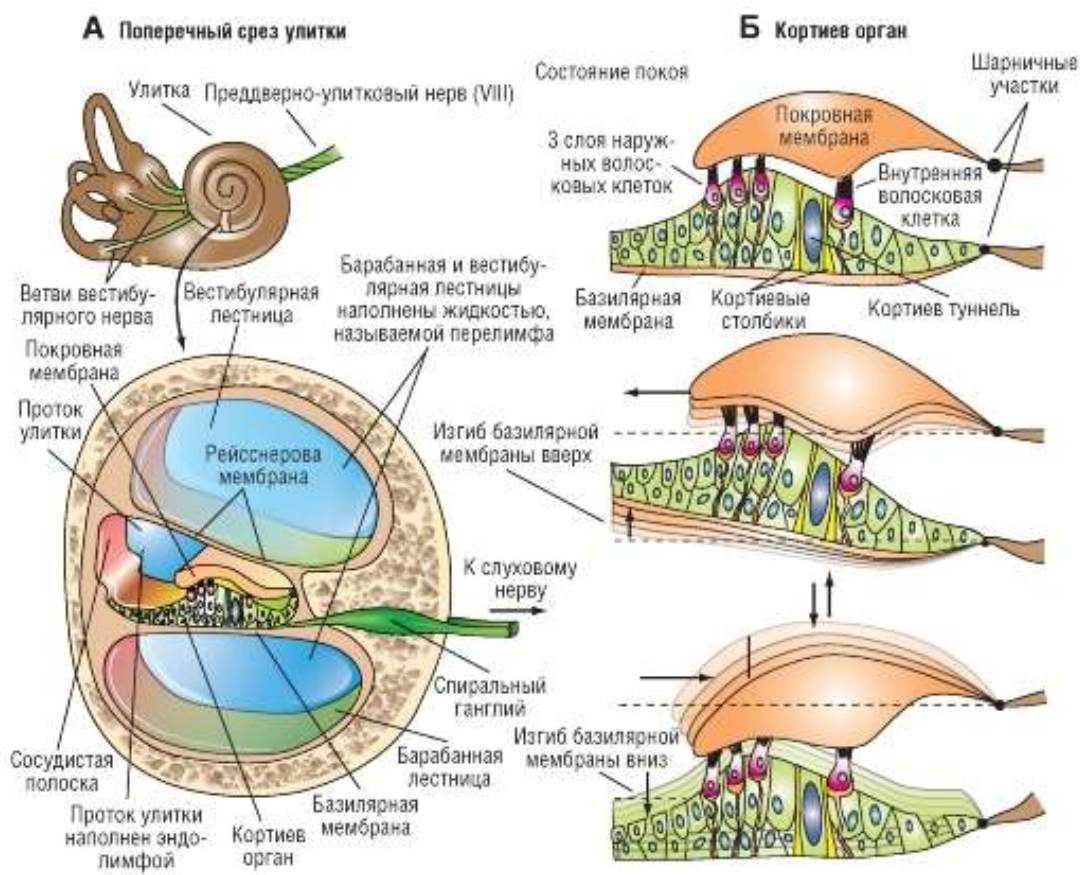
Такие изменения мембранного потенциала волосковых клеток обусловлены сдвигами катионной проводимости мембраны их верхушки. Градиент потенциала, определяющий

вход ионов в волосковую клетку, складывается из потенциала покоя клетки и положительного заряда эндолимфы. Как отмечалось выше, суммарная трансмембранная разность потенциалов составляет примерно 140 mV. Сдвиг проводимости мембраны верхней части волосковой клетки сопровождается значительным ионным током, создающим рецепторный потенциал этих клеток. Показателем ионного тока является внеклеточно регистрируемый микрофонный потенциал улитки - колебательный процесс, частота которого соответствует характеристикам акустического стимула. Этот потенциал представляет собой сумму рецепторных потенциалов некоторого числа волосковых клеток.

Так же как фоторецепторы сетчатки, волосковые клетки высвобождают при деполяризации возбуждающий нейромедиатор (глутамат или аспартат). Под действием нейромедиатора возникает генераторный потенциал в окончаниях улитковых афферентных волокон, на которых волосковые клетки образуют синапсы. Итак, преобразование звука завершается тем, что колебания базилярной мембраны приводят к периодическим разрядам импульсов в афферентных волокнах слухового нерва. Электрическую активность многих афферентных волокон можно зарегистрировать внеклеточно в виде составного потенциала действия.

Оказалось, что на звук определенной частоты отвечает только небольшое число улитковых афферентов. Возникновение ответа зависит от расположения афферентных нервных окончаний вдоль кортиева органа, поскольку при одной и той же частоте звука амплитуда смещений базилярной мембраны не одинакова в разных ее участках. Это отчасти обусловлено различиями ширины мембраны и ее напряжения вдоль кортиева органа. Раньше считалось, что разница резонансной частоты в разных участках базилярной мембраны объясняется различиями ширины и напряжения этих участков. Например, у основания улитки ширина базилярной мембраны 100 μm , а у верхушки - 500 μm . Кроме того, у основания улитки напряжение мембраны больше, чем у верхушки. Следовательно, участок мембраны около основания должен вибрировать с более высокой частотой, чем участок у верхушки, подобно коротким струнам музыкальных инструментов. Однако эксперименты показали, что базилярная мембрана колеблется как единое целое, по ней следуют бегущие волны. При высокочастотных тонах амплитуда волнообразных колебаний базилярной мембраны максимальна ближе к основанию улитки, а при низкочастотных - у верхушки. В действительности базилярная мембрана действует как частотный анализатор; стимул распределяется по ней вдоль кортиева органа таким образом, что волосковые клетки разной локализации отвечают на звуки разной частоты. Это заключение составляет основу теории места. Кроме того, расположенные вдоль кортиева органа волосковые клетки, настроены на разную частоту звука вследствие их биофизических свойств и особенностей стереоцилий. Благодаря этим факторам получается так называемая тонотопическая карта базилярной мембраны и кортиева органа.

Рис. 5-20. Кортиев орган



Периферический отдел вестибулярной системы

Вестибулярная система воспринимает угловое и линейное ускорения головы. Сигналы этой системы запускают движения головы и глаз, обеспечивающие стабильное зрительное изображение на сетчатке, а также коррекцию позы тела для поддержания равновесия.

Строение вестибулярного лабиринта

Так же как улитка, вестибулярный аппарат представляет собой перепончатый лабиринт, находящийся в костном лабиринте (рис. 5-21 А). На каждой стороне головы вестибулярный аппарат образован тремя полукружными каналами [горизонтальным, вертикальным передним (верхним) и вертикальным задним] и двумя отолитовыми органами. Все эти структуры погружены в перилимфу и заполнены эндолимфой. В состав отолитового органа входят утрикулус (*utricle* - эллиптический мешочек, маточка) и саккулус (*sacculus* - сферический мешочек). Один конец каждого полукружного канала расширен в виде ампулы. Все полукружные каналы входят в утрикулус. Утрикулус и саккулус сообщаются между собой через соединяющий проток (*ductus reuniens*). От него берет начало эндолимфатический проток (*ductus endolymphaticus*), заканчивающийся эндолимфатическим мешком, образующим соединение с улиткой. Через это соединение в вестибулярный аппарат поступает эндолимфа, секретируемая сосудистой полоской улитки.

Каждый из полукружных каналов одной стороны головы расположен в той же плоскости, что и соответствующий ему канал другой стороны. Благодаря этому

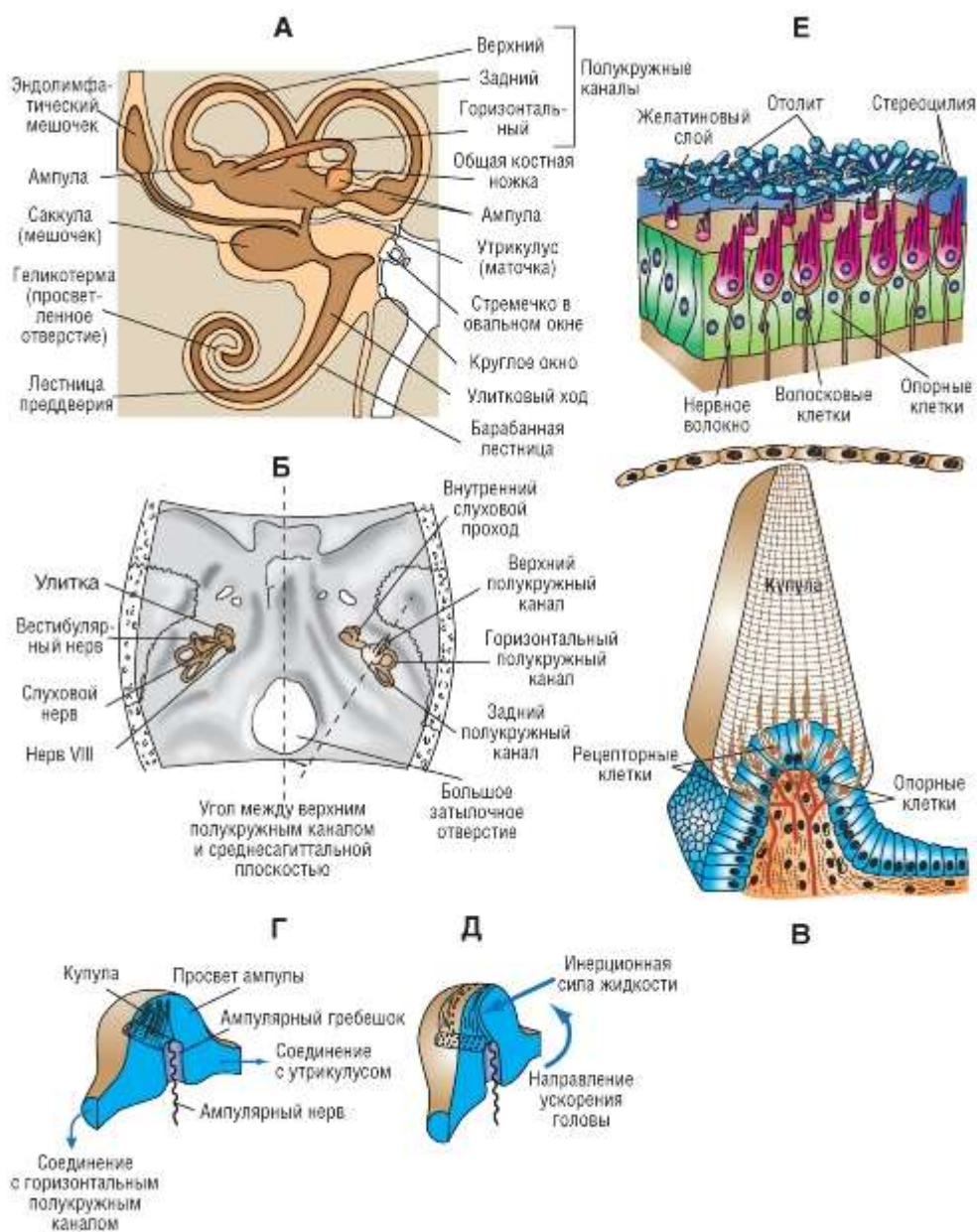
корреспондирующие участки сенсорного эпителия двух парных каналов воспринимают движения головы в любой плоскости. На рисунке 5-21 Б показана ориентация полукружных каналов по обе стороны головы; обратите внимание, что улитка находится рострально от вестибулярного аппарата и что верхушка улитки лежит латерально. Два горизонтальных канала по обе стороны головы образуют пару, так же как два вертикальных передних и два вертикальных задних канала. У горизонтальных каналов есть интересная особенность: они находятся в плоскости горизонта при наклоне головы на 30°. Утрикулус ориентирован почти горизонтально, а саккулус - вертикально.

Ампула каждого полукружного канала содержит сенсорный эпителий в виде так называемого ампулярного гребешка (*crista ampullaris*) с вестибулярными волосковыми клетками (схема разреза через ампулярный гребешок представлена на рис. 5-21 В). Они иннервируются первичными афферентными волокнами вестибулярного нерва, составляющего часть VIII черепного нерва. Каждая волосковая клетка вестибулярного аппарата, подобно аналогичным клеткам улитки, несет на своей верхушке пучок стереоцилий (ресничек). Однако, в отличие от клеток улитки, вестибулярные волосковые клетки еще имеют одиночную киноцилию. Все реснички ампулярных клеток погружены в желеобразную структуру - купулу, которая располагается поперек ампулы, полностью перекрывая ее просвет. При угловом (вращательном) ускорении головы купула отклоняется; соответственно сгибаются реснички волосковых клеток. У купулы такой же удельный вес (плотность), как у эндолимфы, поэтому на нее не влияет линейное ускорение, создаваемое силой тяжести (гравитационное ускорение). На рисунке 5-21 Г, Д представлено положение купулы до поворота головы (Г) и во время поворота (Д).

Сенсорный эпителий отолитовых органов это пятно эллиптического мешочка (*macula utriculi*) и пятно сферического мешочка (*macula sacculi*) (рис. 5-21 Е). Каждая макула (пятно) выстлана вестибулярными волосковыми клетками. Их стереоцилии и киноцилия, так же как реснички волосковых клеток ампулы, погружены в желеобразную массу. Отличие желеобразной массы отолитовых органов в том, что она содержит многочисленные отолиты (мельчайшие «каменистые» включения) - кристаллы карбоната кальция (кальцита). Желеобразная масса вместе с ее отолитами называется отолитовой мембраной. За счет присутствия кристаллов кальцита удельный вес (плотность) отолитовой мембраны примерно в два раза выше, чем у эндолимфы, поэтому отолитовая мембрана легко сдвигается под действием линейного ускорения, создаваемого силой тяжести. Угловое ускорение головы к такому эффекту не приводит, поскольку отолитовая мембрана почти не выступает в просвет перепончатого лабиринта.

Рис. 5-21. Вестибулярная система.

А - строение вестибулярного аппарата. Б - вид сверху на основание черепа. Заметна ориентация структур внутреннего уха. Обратите внимание на пары контралатеральных полукружных каналов, находящиеся в одной плоскости (по два горизонтальных, верхних - передних и нижних - задних канала). В - схема разреза через ампулярный гребешок. Стереоцилии и киноцилия каждой волосковой клетки погружены в купулу. Положение купулы до поворота головы (Г) и во время поворота (Д). Е - строение отолитовых органов



Иннервация сенсорного эпителия вестибулярного аппарата

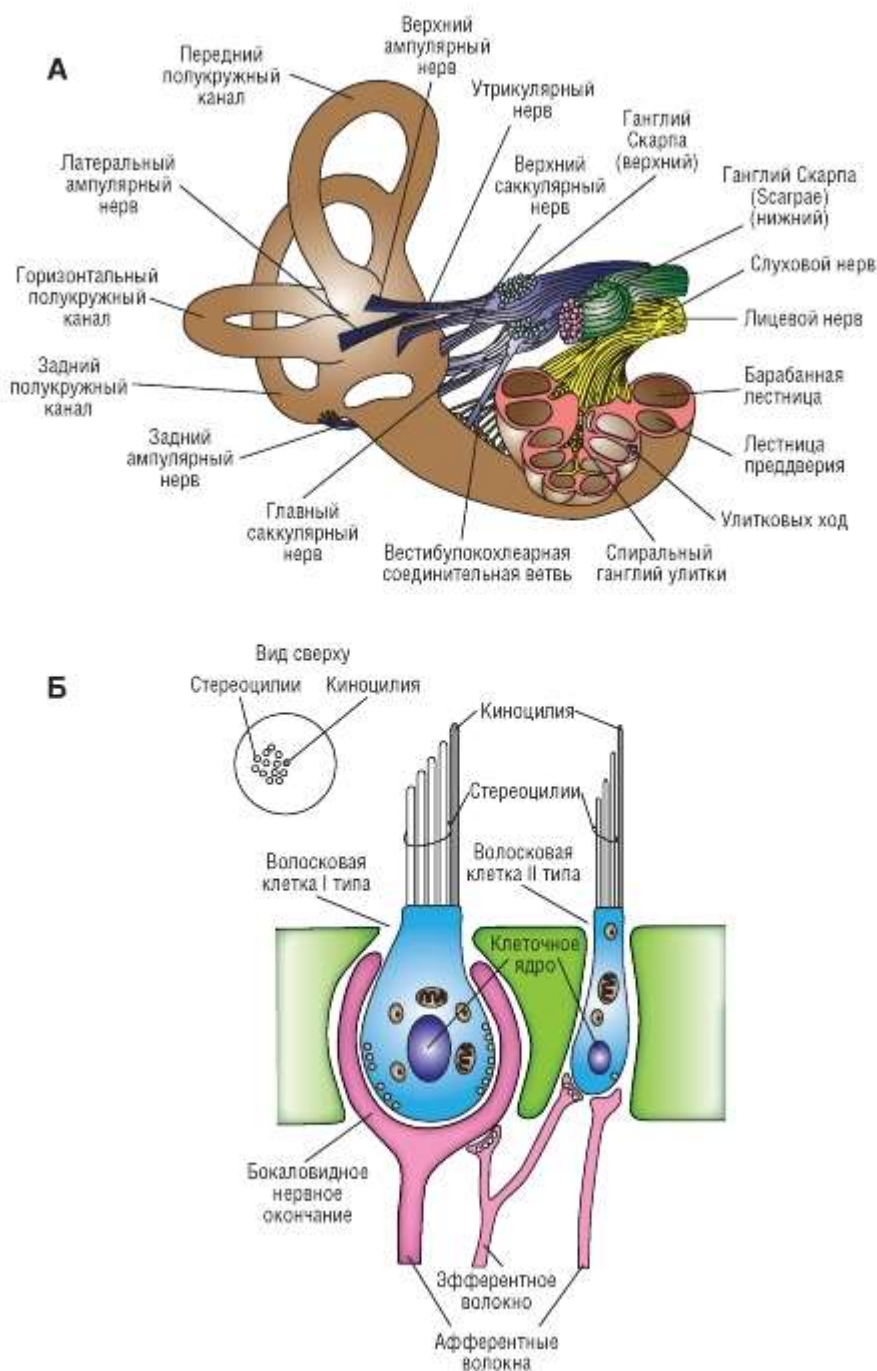
Тела клеток первичных афферентных волокон вестибулярного нерва располагаются в ганглии Scarpa. Так же как нейроны спирального ганглия, это биполярные клетки; их тела и аксоны миелинизированы. Вестибулярный нерв посылает отдельную ветвь к каждой макуле сенсорного эпителия (рис. 5-22 А). Вестибулярный нерв идет вместе с улитковым и лицевым нервами во внутреннем слуховом проходе (*meatus acusticus internus*) черепа.

Вестибулярные волосковые клетки делят на два типа (рис. 5-22 Б). Клетки I типа имеют форму колбы и образуют синаптические соединения с бокаловидными окончаниями первичных афферентов вестибулярного нерва. Клетки II типа цилиндрические, их синаптические контакты находятся на тех же первичных афферентах. Синапсы вестибулярных эфферентных волокон расположены на окончаниях первичных афферентов клеток I типа. С клетками II типа вестибулярные эфферентные волокна образуют прямые синаптические контакты. Такая организация аналогична рассмотренной выше при описании контактов афферентных и эфферентных волокон улиткового нерва с

внутренними и наружными волосковыми клетками кортиева органа. Присутствием эфферентных нервных окончаний на клетках II типа может объясняться нерегулярность разрядов в афферентах этих клеток.

Рис. 5-22.

А - иннервация перепончатого лабиринта. Б - вестибулярные волосковые клетки I и II типов. На врезке справа: вид сверху на стереоцилии и киноцилии. Обратите внимание, где находятся контакты афферентных и эфферентных волокон



Преобразование (трансдукция) вестибулярных сигналов

Так же как у волосковых клеток улитки, мембрана вестибулярных волосковых клеток функционально поляризована. Когда стереоцилии сгибаются в сторону самой длинной

реснички (киноцилии), возрастает катионная проводимость мембраны верхушки клетки, и вестибулярная волосковая клетка деполяризуется (рис. 5-23 В). И наоборот, при наклоне стереоцилий в противоположную сторону происходит гиперполяризация клетки. Из волосковой клетки тонически (постоянно) высвобождается возбуждающий нейромедиатор (глутамат либо аспартат), так что афферентное волокно, на котором эта клетка образует синапс, генерирует импульсную активность спонтанно, при отсутствии сигналов. При деполяризации клетки увеличивается высвобождение нейромедиатора, и частота разряда в афферентном волокне возрастает. В случае гиперполяризации, наоборот, высвобождается меньшее количество нейромедиатора, и частота разряда снижается вплоть до полного прекращения импульсации.

Полукружные каналы

Как уже говорилось, при поворотах головы волосковые клетки ампулы получают сенсорную информацию, которую они направляют в головной мозг. Механизм этого явления заключается в том, что угловые ускорения (повороты головы) сопровождаются сгибанием ресничек на волосковых клетках ампулярного гребешка и как следствие сдвигом мембранного потенциала и изменением количества высвобождаемого нейромедиатора. При угловых ускорениях эндолимфа в силу своей инерции смещается относительно стенки перепончатого лабиринта и давит на купулу. Сдвиговое усилие заставляет реснички сгибаться. Все реснички клеток каждого ампулярного гребешка ориентированы в одинаковом направлении. В горизонтальном полукружном канале реснички обращены к утрикулусу, в ампулах двух других полукружных каналов - от утрикулуса.

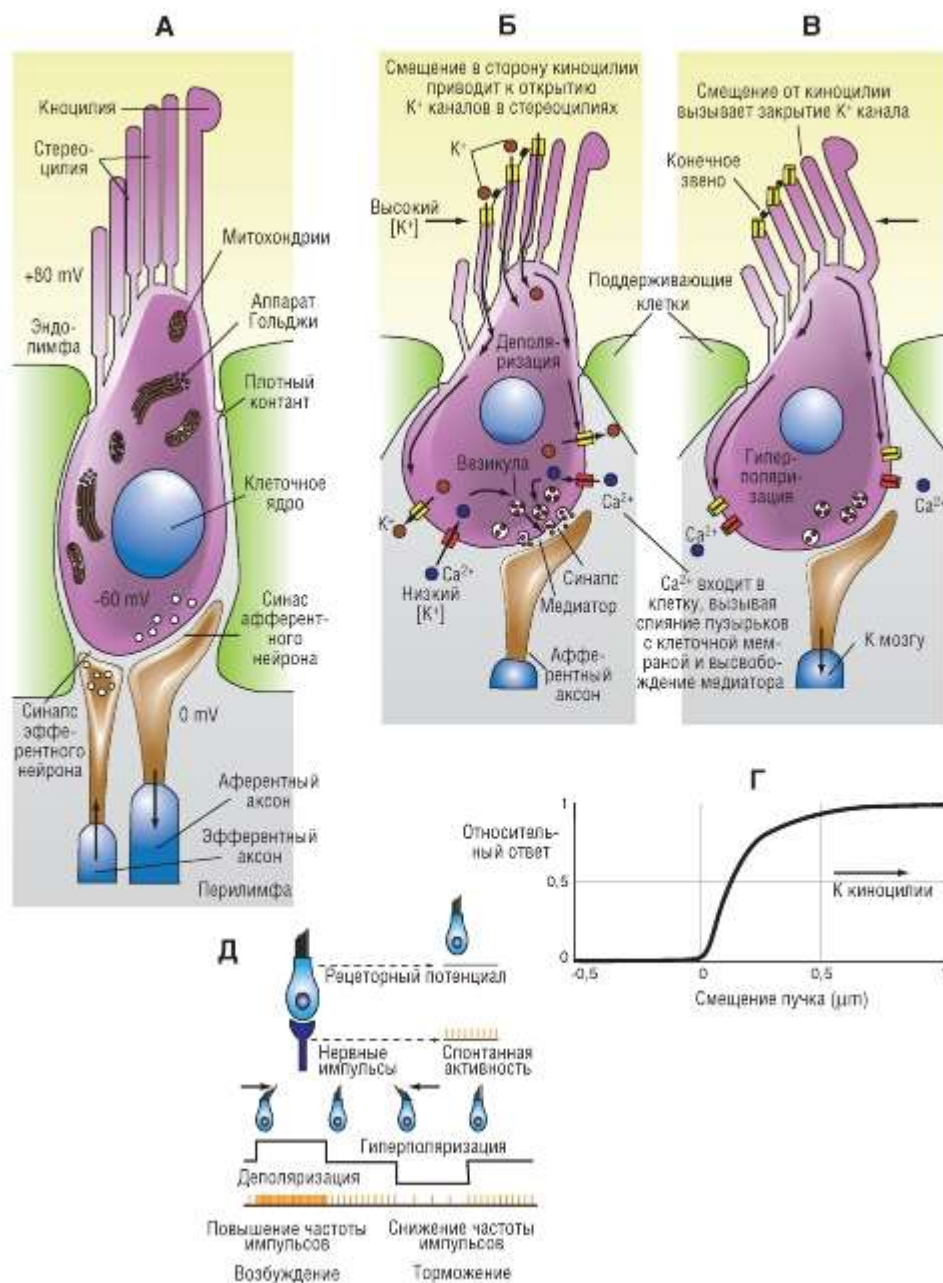
Изменения разряда афферентов вестибулярного нерва под действием углового ускорения можно обсудить на примере горизонтального полукружного канала. Киноцилии всех волосковых клеток обычно обращены к утрикулусу. Следовательно, при сгибании ресничек к утрикулусу частота афферентного разряда повышается, а при их сгибании от утрикулуса - снижается. При повороте головы налево эндолимфа в горизонтальных полукружных каналах смещается вправо. В результате реснички волосковых клеток левого канала сгибаются в сторону утрикулуса, а в правом канале - от утрикулуса. Соответственно частота разряда в афферентах левого горизонтального канала повышается, а в афферентах правого - уменьшается.

Рис. 5-23. Механические преобразования в волосковых клетках.

А - Волосковая клетка;

Б - Положительная механическая деформация; В - Отрицательная механическая деформация; Г - Механическая чувствительность волосковой клетки;

Д - функциональная поляризация вестибулярных волосковых клеток. При сгибании стереоцилий по направлению к киноцилии волосковая клетка деполяризуется и в афферентном волокне возникает возбуждение. При сгибании стереоцилий в сторону от киноцилии волосковая клетка гиперполяризуется и афферентный разряд ослабевает или прекращается



Мышечные рецепторы растяжения

Несколько важных спинальных рефлексов активируются мышечными рецепторами растяжения - мышечными веретенами и сухожильным аппаратом Гольджи. Это мышечный рефлекс на растяжение (миотатический рефлекс) и обратный миотатический рефлекс, нужные для поддержания позы.

Другой значимый рефлекс - сгибательный, вызывается сигналами от различных сенсорных рецепторов кожи, мышц, суставов и внутренних органов. Аfferентные волокна, вызывающие этот рефлекс, часто называются аfferентами сгибательного рефлекса.

Строение и функции мышечного веретена

Структура и функции мышечных веретен очень сложны. Они присутствуют в большинстве скелетных мышц, но их особенно много в мышцах, требующих тонкой регуляции движений (например, в мелких мышцах кисти). Что касается крупных мышц,

то мышечных веретен больше всего в мышцах, содержащих много медленных фазических волокон (волокон I типа; *slow twitch fibers*).

Веретено состоит из пучка модифицированных мышечных волокон, иннервируемых и сенсорными, и двигательными аксонами (рис. 5-24 А). Диаметр мышечного веретена равен примерно 100 мкм, длина - до 10 мм. Иннервированная часть мышечного веретена заключена в соединительнотканную капсулу. Так называемое лимфатическое пространство капсулы заполнено жидкостью. Мышечное веретено свободно располагается между обычными мышечными волокнами. Дистальный его конец прикреплен к эндомиозию - соединительнотканной сети внутри мышцы. Мышечные веретена лежат параллельно обычным поперечнополосатым мышечным волокнам.

Мышечное веретено содержит модифицированные мышечные волокна, называемые интрафузальными мышечными волокнами, в отличие от обычных - экстрафузальных мышечных волокон. Интрафузальные волокна гораздо тоньше, чем экстрафузальные, и слишком слабы, чтобы участвовать в сокращении мышцы. Различают два типа интрафузальных мышечных волокон: с ядерной сумкой и с ядерной цепочкой (рис. 5-24 Б). Их названия связаны с организацией клеточных ядер. Волокна с ядерной сумкой крупнее, чем волокна с ядерной цепочкой, и их ядра плотно упакованы в средней части волокна напоподобие сумки с апельсинами. В волокнах с ядерной цепочкой все ядра расположены в один ряд.

Мышечные веретена получают сложную иннервацию. Сенсорная иннервация состоит из одного афферентного аксона группы Ia и нескольких афферентов группы II (рис. 5-24 Б). Афференты группы Ia относят к классу сенсорных аксонов наибольшего диаметра со скоростью проведения от 72 до 120 м/с; аксоны группы II имеют промежуточный диаметр и проводят импульсы со скоростью от 36 до 72 м/с. Афферентный аксон группы Ia образует первичное окончание, спирально обвивающее каждое интрафузальное волокно. Первичные окончания есть на интрафузальных волокнах обоих типов, что важно для деятельности этих рецепторов. Афференты группы II образуют вторичные окончания на волокнах с ядерной цепочкой.

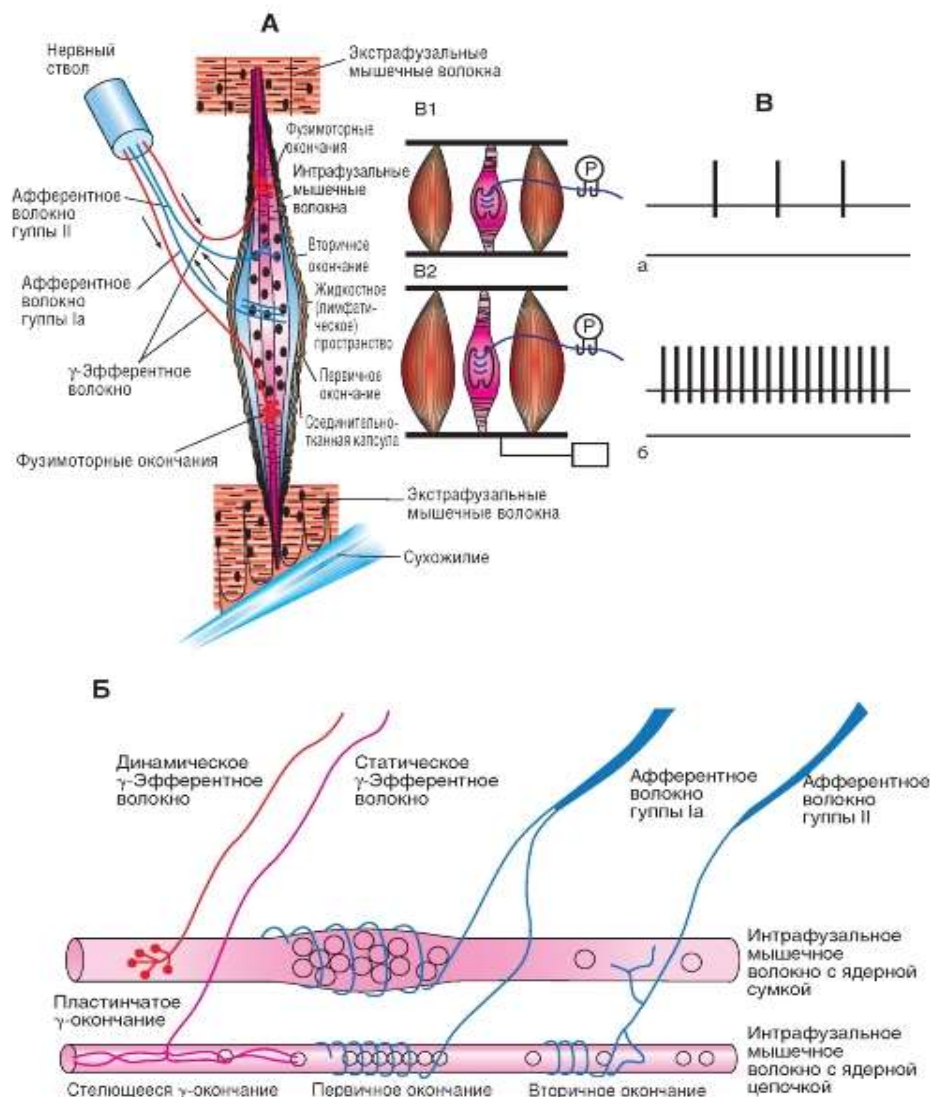
Двигательную иннервацию мышечных веретен обеспечивают два типа γ -эфферентных аксонов (рис. 5-24 Б). Динамические γ -эфференты оканчиваются на каждом волокне с ядерной сумкой, статические γ -эфференты - на волокнах с ядерной цепочкой. γ -Эфферентные аксоны тоньше, чем α -эфференты экстрафузальных мышечных волокон, поэтому они проводят возбуждение с меньшей скоростью.

Мышечное веретено реагирует на растяжение мышцы. На рисунке 5-24 В показано изменение активности афферентного аксона при переходе мышечного веретена от укороченного состояния во время сокращения экстрафузальных волокон к состоянию удлинения при растяжении мышцы. Сокращение экстрафузальных мышечных волокон заставляет мышечное веретено укорачиваться, поскольку оно лежит параллельно экстрафузальным волокнам (см. выше).

Активность афферентов мышечных веретен зависит от механического растяжения афферентных окончаний на интрафузальных волокнах. При сокращении экстрафузальных волокон мышечное волокно укорачивается, расстояние между витками афферентного нервного окончания уменьшается, и частота разряда в афферентном аксоне падает. И наоборот, когда вся мышца подвергается растяжению, мышечное веретено тоже удлиняется (потому что его концы прикреплены к соединительнотканной сети внутри мышцы), и растягивание афферентного окончания повышает частоту его импульсного разряда.

Рис. 5-24. Сенсорные рецепторы, ответственные за вызывание спинальных рефлексов.

А - схема мышечного веретена. Б - интрафузальные волокна с ядерной сумкой и ядерной цепочкой; их сенсорная и двигательная иннервация. В - изменения частоты импульсного разряда афферентного аксона мышечного веретена во время укорочения мышцы (при ее сокращении) (а) и во время удлинения мышцы (при ее растяжении) (б). В1 - во время сокращения мышцы нагрузка на мышечное веретено уменьшается, поскольку оно расположено параллельно обычным мышечным волокнам. В2 - при растяжении мышцы мышечное веретено удлиняется. Р - регистрирующая система



Мышечные рецепторы растяжения

Известен способ влияния афферентов на рефлекторную активность - через их взаимодействие с интрафузальными волокнами с ядерной сумкой и волокнами с ядерной цепочкой. Как упомянуто выше, есть два типа γ -мотонейронов: динамические и статические. Динамические двигательные γ -аксоны оканчиваются на интрафузальных волокнах с ядерной сумкой, а статические - на волокнах с ядерной цепочкой. При активации динамического γ -мотонейрона усиливается динамический ответ афферентов группы Ia (рис. 5-25 А4), а при активации статического γ -мотонейрона возрастают статические ответы афферентов обеих групп - Ia и II (рис. 5-25 А3), и одновременно может снижаться динамический ответ. Разные нисходящие пути оказывают предпочтительное влияние на динамические либо на статические γ -мотонейроны, изменяя таким образом характер рефлекторной активности спинного мозга.

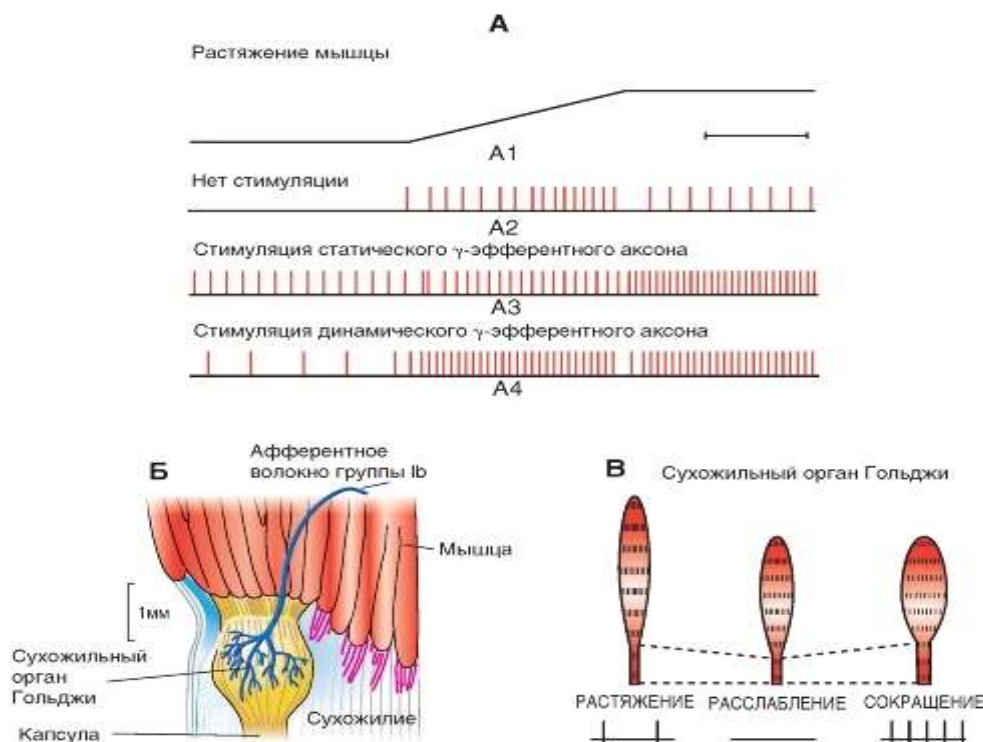
Сухожильный аппарат Гольджи

В скелетных мышцах есть еще один тип рецепторов растяжения - сухожильный аппарат Гольджи (рис. 5-25 Б). Рецептор диаметром около 100 мкм и длиной примерно 1 мм образован окончаниями афферентов группы Ib - толстых аксонов с такой же скоростью проведения импульса, как и у афферентов группы Ia. Эти окончания обертываются вокруг пучков коллагеновых нитей в сухожилии мышцы (или в сухожильных включениях внутри мышцы). Чувствительное окончание сухожильного аппарата организовано по отношению к мышце последовательно, в отличие от мышечных веретен, лежащих параллельно экстрафузальным волокнам.

Благодаря своему последовательному расположению сухожильный аппарат Гольджи активируется или при сокращении, или при растяжении мышцы (рис. 5-25 В). Однако сокращение мышцы - более эффективный стимул, чем растяжение, поскольку стимулом для сухожильного аппарата служит сила, развиваемая сухожилием, в котором находится рецептор. Таким образом, сухожильный аппарат Гольджи - датчик силы, в отличие от мышечного веретена, подающего сигналы о длине мышцы и скорости ее изменения.

Рис. 5-25. Мышечные рецепторы растяжения.

А - влияние статических и динамических γ -мотонейронов на ответы первичного окончания при растяжении мышцы. А1 - временной ход растяжения мышцы. А2 - разряд аксона группы Ia при отсутствии активности γ -мотонейрона. А3 - ответ во время стимуляции статического γ -эфферентного аксона. А4 - ответ во время стимуляции динамического γ -эфферентного аксона. Б - схема расположения сухожильного аппарата Гольджи. В - активация сухожильного аппарата Гольджи во время растяжения мышцы (слева) или сокращения мышцы (справа)



Функционирование мышечных веретен

Частота разряда в афферентах группы Ia и группы II пропорциональна длине мышечного веретена; это заметно как во время линейного растяжения (рис. 5-26 А, слева), так и при расслаблении мышцы после растяжения (рис. 5-26 А, справа). Такую реакцию называют статическим ответом афферентов мышечного веретена. Однако первичные и вторичные афферентные окончания отвечают на растяжение по-разному. Первичные окончания чувствительны и к степени растяжения, и к его скорости, тогда как вторичные окончания реагируют преимущественно на величину растяжения (рис. 5-26 А). Эти различия определяют характер активности окончаний двух типов. Частота разряда первичного окончания достигает максимума во время растяжения мышцы, а при расслаблении растянутой мышцы разряд прекращается. Реакцию такого типа называют динамическим ответом афферентных аксонов группы Ia. Ответы в центре рисунка (рис. 5-26 А) - это примеры динамических ответов первичного окончания. Постукивание по мышце (либо по ее сухожилию) или синусоидальное растяжение более эффективно вызывают разряд в первичном афферентном окончании, чем во вторичном.

Судя по характеру ответов, первичные афферентные окончания сигнализируют как о мышечной длине, так и о скорости ее изменения, а вторичные окончания передают информацию только о длине мышцы. Эти различия в поведении первичных и вторичных окончаний зависят в основном от разницы механических свойств интрафузальных волокон с ядерной сумкой и с ядерной цепочкой. Как указывалось выше, первичные и вторичные окончания есть на волокнах обоих типов, тогда как вторичные окончания расположены преимущественно на волокнах с ядерной цепочкой. Средняя (экваториальная) часть волокна с ядерной сумкой лишена сократительных белков из-за скопления клеточных ядер, поэтому эта часть волокна легко растягивается. Однако сразу после растяжения средняя часть волокна с ядерной сумкой стремится вернуться к своей исходной длине, хотя концевые части волокна удлиняются. Феномен, который называется «оползание», обусловлен вязкоупругими свойствами этого интрафузального волокна. В результате наблюдается вспышка активности первичного окончания с последующим ослаблением активности до нового статического уровня частоты импульсов.

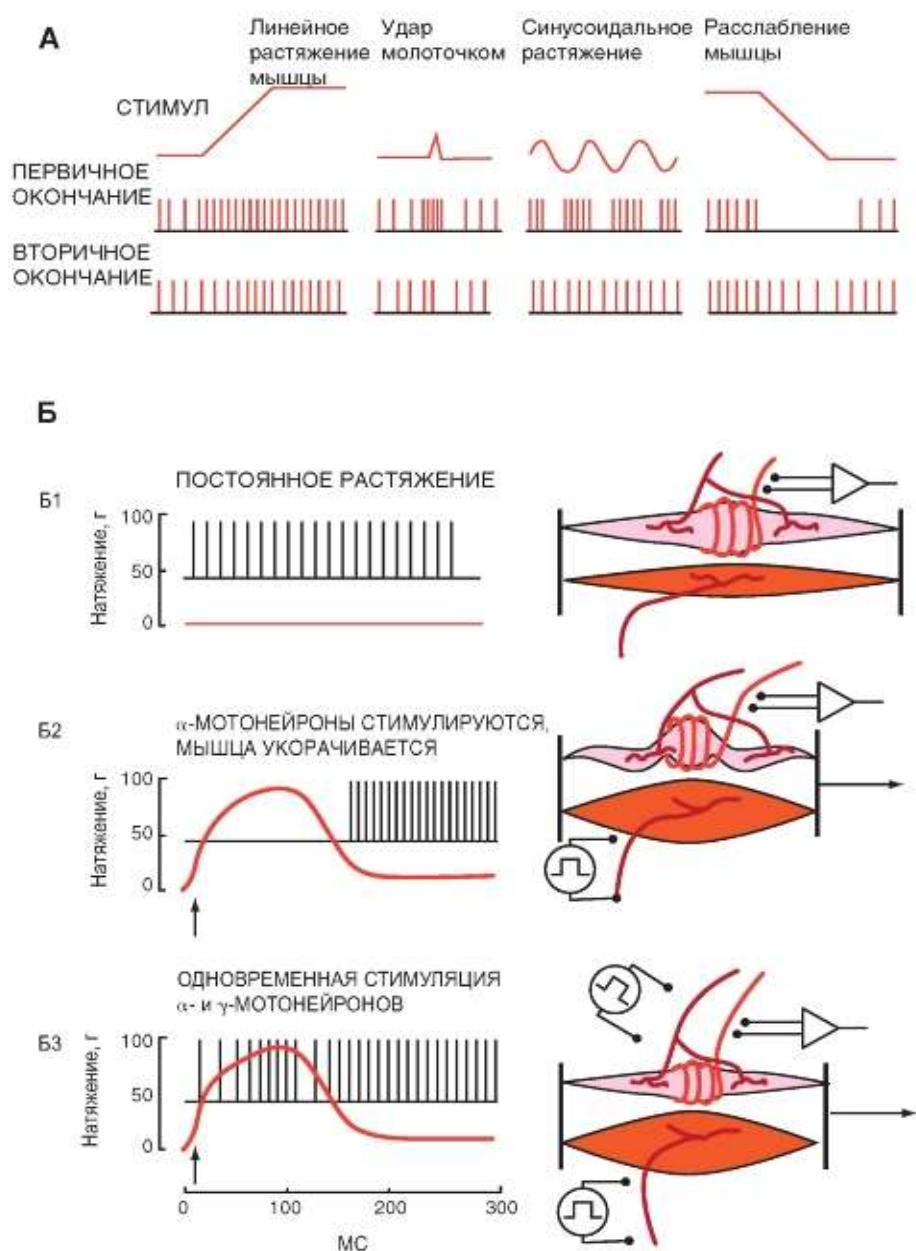
В отличие от волокон с ядерной сумкой, у волокон с ядерной цепочкой длина изменяется в более близком соответствии с изменениями длины экстрафузальных мышечных волокон, потому что средняя часть волокон с ядерной цепочкой содержит сократительные белки. Следовательно, вязкоупругие характеристики волокна с ядерной цепочкой более однородны, оно не подвержено оползанию, и его вторичные афферентные окончания генерируют только статические ответы.

До сих пор мы рассматривали поведение мышечных веретен только при отсутствии активности γ -мотонейронов. Вместе с тем эфферентная иннервация мышечных веретен чрезвычайно значима, поскольку она определяет чувствительность мышечных веретен к растяжению. Например, на рис. 5-26 Б1 представлена активность афферента мышечного веретена во время постоянного растяжения. Как уже говорилось, при сокращении экстрафузальных волокон (рис. 5-26 Б2) мышечные веретена перестают испытывать нагрузку, и разряд их афферентов прекращается. Однако влиянию разгрузки мышечного веретена противодействует эффект стимуляции γ -мотонейронов. Такая стимуляция заставляет мышечное веретено укорачиваться вместе с экстрафузальными волокнами (рис. 5-26 Б3). Точнее, укорачиваются только два конца мышечного веретена; срединная (экваториальная) его часть, где находятся клеточные ядра, не сокращается из-за отсутствия сократительных белков. В результате срединная часть веретена удлиняется, так что афферентные окончания растягиваются и возбуждаются. Этот механизм очень важен для нормальной деятельности мышечных веретен, так как в результате нисходящих двигательных команд от головного мозга происходит, как правило, одновременная

активация α - и γ -мотонейронов и, следовательно, сопряженное сокращение экстрафузальных и интрафузальных мышечных волокон.

Рис. 5-26. Мышечные веретена и их работа.

А - ответы первичного и вторичного окончания на разнообразные виды изменений длины мышцы; продемонстрированы различия динамических и статических ответов. Верхние кривые показывают характер изменений мышечной длины. Средний и нижний ряд записей - импульсные разряды первичных и вторичных нервных окончаний. Б - активация γ -эфферентного аксона противодействует эффекту разгрузки мышечного веретена. Б1 - импульсный разряд афферента мышечного веретена при постоянном растяжении веретена. Б2 - афферентный разряд прекратился во время сокращения экстрафузальных мышечных волокон, поскольку с веретена снята нагрузка. Б3 - активация γ -мотонейрона вызывает укорочение мышечного веретена, противодействующее эффекту разгрузки



Миотатический рефлекс, или рефлекс на растяжение

Рефлексу на растяжение принадлежит ключевая роль в поддержании позы. Кроме того, его изменения участвуют в реализации двигательных команд от головного мозга. Патологические нарушения этого рефлекса служат признаками неврологических заболеваний. Рефлекс проявляется в двух формах: фазический рефлекс на растяжение, запускается первичными окончаниями мышечных веретен, а тонический рефлекс на растяжение зависит как от первичных, так и от вторичных окончаний.

Фазический рефлекс на растяжение

Соответствующая рефлекторная дуга показана на рис. 5-27. Афферентный аксон группы Ia от мышечного веретена прямой мышцы бедра входит в спинной мозг и разветвляется. Его ветви поступают в серое вещество спинного мозга. Некоторые из них оканчиваются непосредственно (моносинаптически) на α -мотонейронах, посылающих двигательные аксоны к прямой мышце бедра (и к ее синергистам, таким, как промежуточная широкая мышца бедра), разгибающей ногу в колене. Аксоны группы Ia обеспечивают моносинаптическое возбуждение α -мотонейрона. При достаточном уровне возбуждения мотонейрон генерирует разряд, вызывающий сокращение мышцы.

Другие ветви аксона группы Ia образуют окончания на тормозных интернейронах группы Ia (такой интернейрон показан черным на рис. 5-27). Эти тормозные интернейроны оканчиваются на α -мотонейронах, иннервирующих мышцы, которые соединены с подколенным сухожилием (в том числе полусухожильную мышцу), - антагонистические мышцы-сгибатели колена. При возбуждении тормозных интернейронов Ia подавляется активность мотонейронов мышц-антагонистов. Таким образом, разряд (стимулирующая активность) афферентов группы Ia от мышечных веретен прямой мышцы бедра вызывает быстрое сокращение этой же мышцы и сопряженное расслабление мышц, соединенных с подколенным сухожилием.

Рефлекторная дуга организована так, что обеспечивается активация определенной группы α -мотонейронов и одновременное торможение антагонистической группы нейронов. Это называется реципрокной иннервацией. Она свойственна многим рефлексам, но не единственно возможная в системах регуляции движений. В некоторых случаях двигательные команды вызывают сопряженное сокращение синергистов и антагонистов. Например, при сжимании кисти в кулак мышцы-разгибатели и мышцы-сгибатели кисти сокращаются, фиксируя положение кисти.

Импульсный разряд афферентов группы Ia наблюдается, когда врач наносит неврологическим молоточком легкий удар по сухожилию мышцы, обычно четырехглавой мышцы бедра. Нормальная реакция - кратковременное мышечное сокращение.

Тонический рефлекс на растяжение

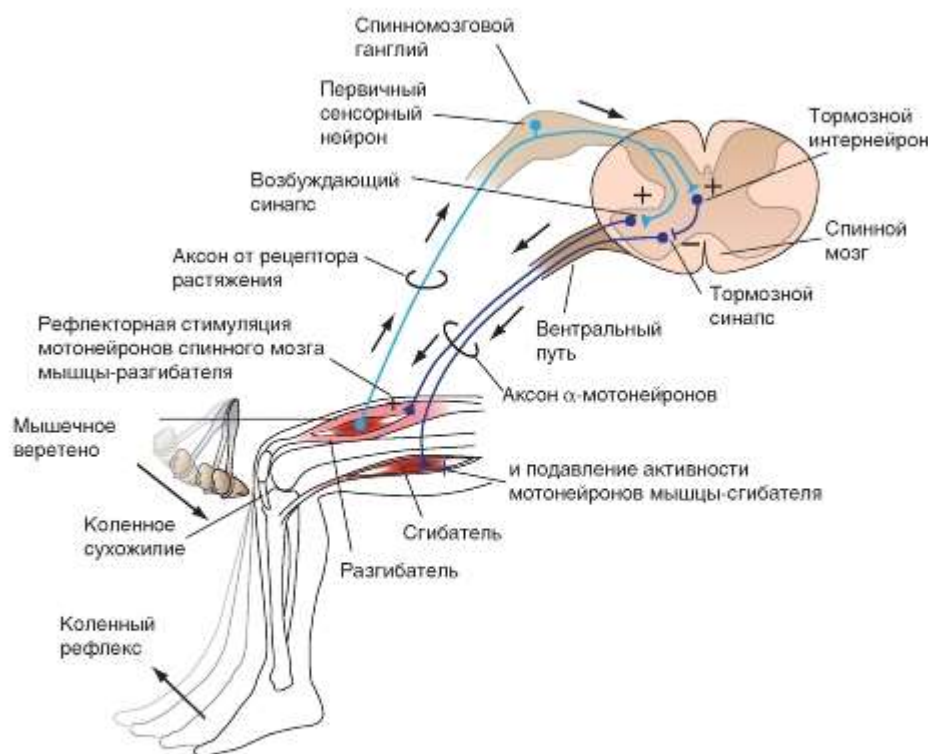
Этот вид рефлекса активируется пассивным сгибанием сустава. Рефлекторная дуга такая же, как у фазического рефлекса на растяжение (рис. 5-27), с той разницей, что участвуют афференты обеих групп - Ia и II. Многие аксоны группы II образуют моносинаптические возбуждающие связи с α -мотонейронами. Следовательно, тонические рефлексы на растяжение - в основном моносинаптические, так же как фазические рефлексы на растяжение. Тонические рефлексы на растяжение вносят вклад в мышечный тонус.

γ -Мотонейроны и рефлексы на растяжение

γ -Мотонейроны регулируют чувствительность рефлексов на растяжение. Афференты мышечных веретен не оказывают прямого влияния на γ -мотонейроны, которые активируются полисинаптически только афферентами сгибательного рефлекса на спинальном уровне, а также нисходящими командами из головного мозга.

Рис. 5-27. Миотатический рефлекс.

Дуга рефлекса на растяжение. Интернейрон (показан черным) относится к тормозным интернейронам группы Ia



Обратный миотатический рефлекс

Активация сухожильного аппарата Гольджи сопровождается рефлекторной реакцией, которая на первый взгляд противоположна рефлексу на растяжение (на самом деле эта реакция дополняет рефлекс на растяжение). Реакцию называют обратным миотатическим рефлексом; соответствующая рефлекторная дуга представлена на рис. 5-28. Сенсорные рецепторы этого рефлекса - сухожильный аппарат Гольджи в прямой мышце бедра. Аfferентные аксоны входят в спинной мозг, разветвляются и образуют синаптические окончания на интернейронах. Путь от сухожильного аппарата Гольджи не имеет моносинаптической связи с α-мотонейронами, а включает в себя тормозные интернейроны, подавляющие активность α-мотонейронов прямой мышцы бедра, и возбуждающие интернейроны, которые вызывают активность α-мотонейронов мышц-антагонистов. Таким образом, по своей организации обратный миотатический рефлекс противоположен рефлексу на растяжение, откуда и произошло название. Однако в действительности обратный миотатический рефлекс функционально дополняет рефлекс на растяжение. Сухожильный аппарат Гольджи служит датчиком силы, развиваемой сухожилием, с которым он соединен. Когда при поддержании стабильной позы (например, человек стоит в положении «смирно») прямая мышца бедра начинает утомляться, прилагаемая к коленному сухожилию сила уменьшается и, следовательно, снижается активность соответствующих сухожильных рецепторов Гольджи. Поскольку обычно эти

рецепторы подавляют активность α -мотонейронов прямой мышцы бедра, ослабление импульсных разрядов от них приводит к повышению возбудимости α -мотонейронов, и сила, развиваемая мышцей, возрастает. В итоге происходит координированное изменение рефлекторных реакций с участием как мышечных веретен, так и афферентных аксонов сухожильного аппарата Гольджи, сокращение прямой мышцы усиливается, и поза сохраняется.

При чрезмерной активации рефлексов можно наблюдать рефлекс «складного нога». Когда сустав пассивно сгибается, сопротивление такому сгибанию сначала увеличивается. Однако по мере дальнейшего сгибания сопротивление внезапно падает, и сустав резко переходит в свое конечное положение. Причина этого - рефлекторное торможение. Раньше рефлекс складного нога объясняли активацией сухожильных рецепторов Гольджи, поскольку считалось, что у них высокий порог реакции на мышечное растяжение. Однако теперь рефлекс связывают с активацией других высокопороговых мышечных рецепторов, находящихся в мышечной фасции.

Рис. 5-28. Обратный миотатический рефлекс.

Дуга обратного миотатического рефлекса. Участвуют как возбуждающие интернейроны, так и тормозные



Сгибательные рефлексы

Афферентное звено сгибательных рефлексов начинается от нескольких типов рецепторов. При сгибательных рефлексах афферентные разряды приводят к тому, что, во-первых, возбуждающие интернейроны вызывают активацию α -мотонейронов, снабжающих мышцы-сгибатели ипсилатеральной конечности, и, во-вторых, тормозные нейроны не позволяют активироваться α -мотонейронам антагонистических мышц-разгибателей (рис. 5-29). Вследствие этого один или несколько суставов сгибаются. Кроме того, комиссуральные интернейроны вызывают функционально противоположную активность мотонейронов на контралатеральной стороне спинного мозга, так что

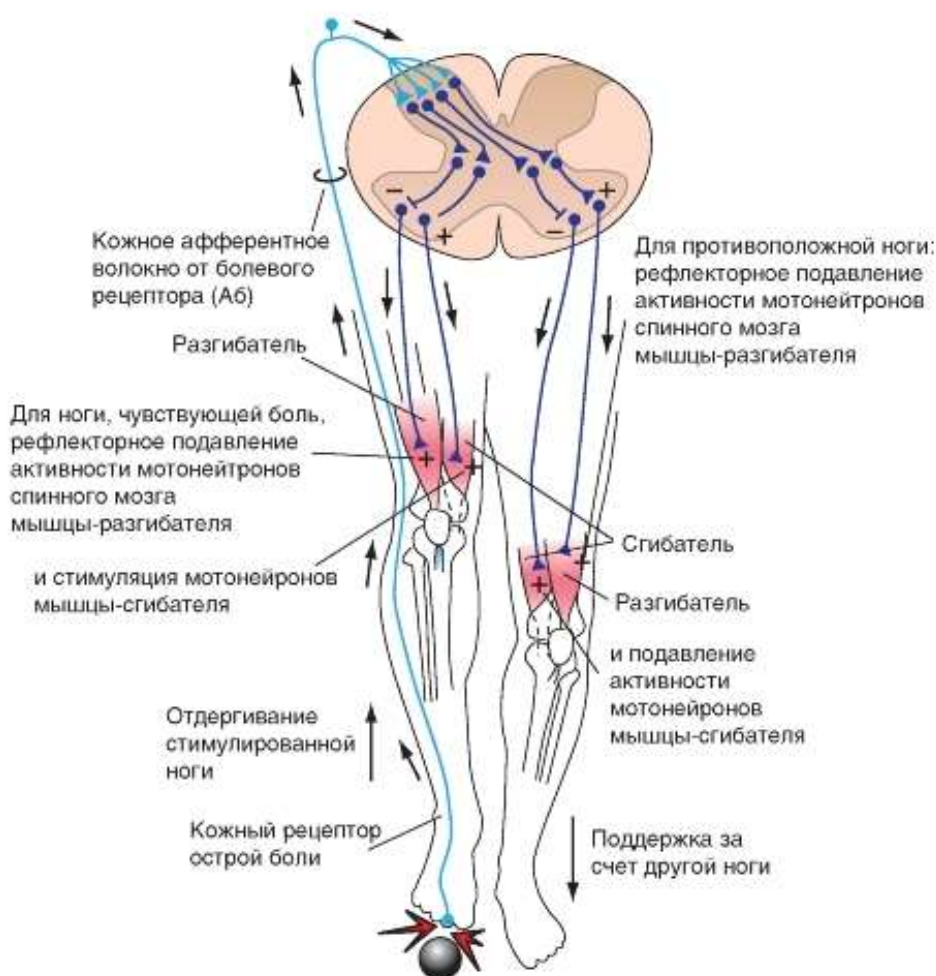
осуществляется разгибание мышцы - перекрестный разгибательный рефлекс. Такой контралатеральный эффект помогает поддерживать равновесие тела.

Есть несколько типов сгибательных рефлексов, хотя характер соответствующих им мышечных сокращений близок. Важный этап локомоции - фаза сгибания, которую можно рассматривать как сгибательный рефлекс. Он обеспечивается главным образом нейронной сетью спинного мозга, называемой генератором локомоторного цикла. Однако под влиянием афферентного входа локомоторный цикл может адаптироваться к секундным изменениям опоры конечностей.

Самый мощный сгибательный рефлекс - это сгибательный рефлекс отдергивания. Он преобладает над другими рефлексами, в том числе локомоторными, видимо, по той причине, что предупреждает дальнейшее повреждение конечности. Этот рефлекс можно наблюдать, когда идущая собака поджимает пораненную лапу. Афферентное звено рефлекса образовано ноцицепторами.

При этом рефлекс сильный болевой стимул заставляет конечность отдернуться. На рисунке 5-29 представлена нейронная сеть конкретного сгибательного рефлекса для коленного сустава. Однако в действительности при сгибательном рефлекс происходит значительная дивергенция сигналов первичных афферентов и интернейронных путей, благодаря которой в рефлекс отдергивания могут вовлекаться все основные суставы конечности (бедренный, коленный, голеностопный). Особенности сгибательного рефлекса отдергивания в каждом конкретном случае зависят от природы и локализации стимула.

Рис. 5-29. Сгибательный рефлекс



Симпатический отдел вегетативной нервной системы

Тела преганглионарных симпатических нейронов сосредоточены в промежуточном и боковом сером веществе (интермедиолатеральном столбе) грудных и поясничных сегментов спинного мозга (рис. 5-30). Некоторые нейроны обнаружены в сегментах С8. Наряду с локализацией в интермедиолатеральном столбе обнаружена локализация преганглионарных симпатических нейронов также в боковом канатике, промежуточной области и пластине Х (дорсальнее центрального канала).

У большинства преганглионарных симпатических нейронов тонкие миелинизированные аксоны - В-волокна. Однако некоторые аксоны относятся к немиелинизированным С-волокну. Преганглионарные аксоны покидают спинной мозг в составе переднего корешка и через белые соединительные ветви входят в паравертебральный ганглий на уровне того же сегмента. Белые соединительные ветви имеются только на уровнях Т1-L2. Преганглионарные аксоны оканчиваются синапсами в этом ганглии или, пройдя через него, входят в симпатический ствол (симпатическую цепочку) паравертебральных ганглиев либо во внутренностный нерв.

В составе симпатической цепочки преганглионарные аксоны направляются роstralно либо каудально к ближайшему или удаленному превертебральному ганглию и там образуют синапсы. Выйдя из ганглия, постганглионарные аксоны идут к спинальному нерву обычно через серую соединительную ветвь, которая есть у каждого из 31 пары спинальных нервов. В составе периферических нервов постганглионарные аксоны поступают к эффекторам кожи (пилоэректорным мышцам, кровеносным сосудам, потовым железам), мышц, суставов. Как правило, постганглионарные аксоны немиелинизированы (С-волокна), хотя есть исключения. Различия между белыми и серыми соединительными ветвями зависят от относительного содержания в них миелинизированных и немиелинизированных аксонов.

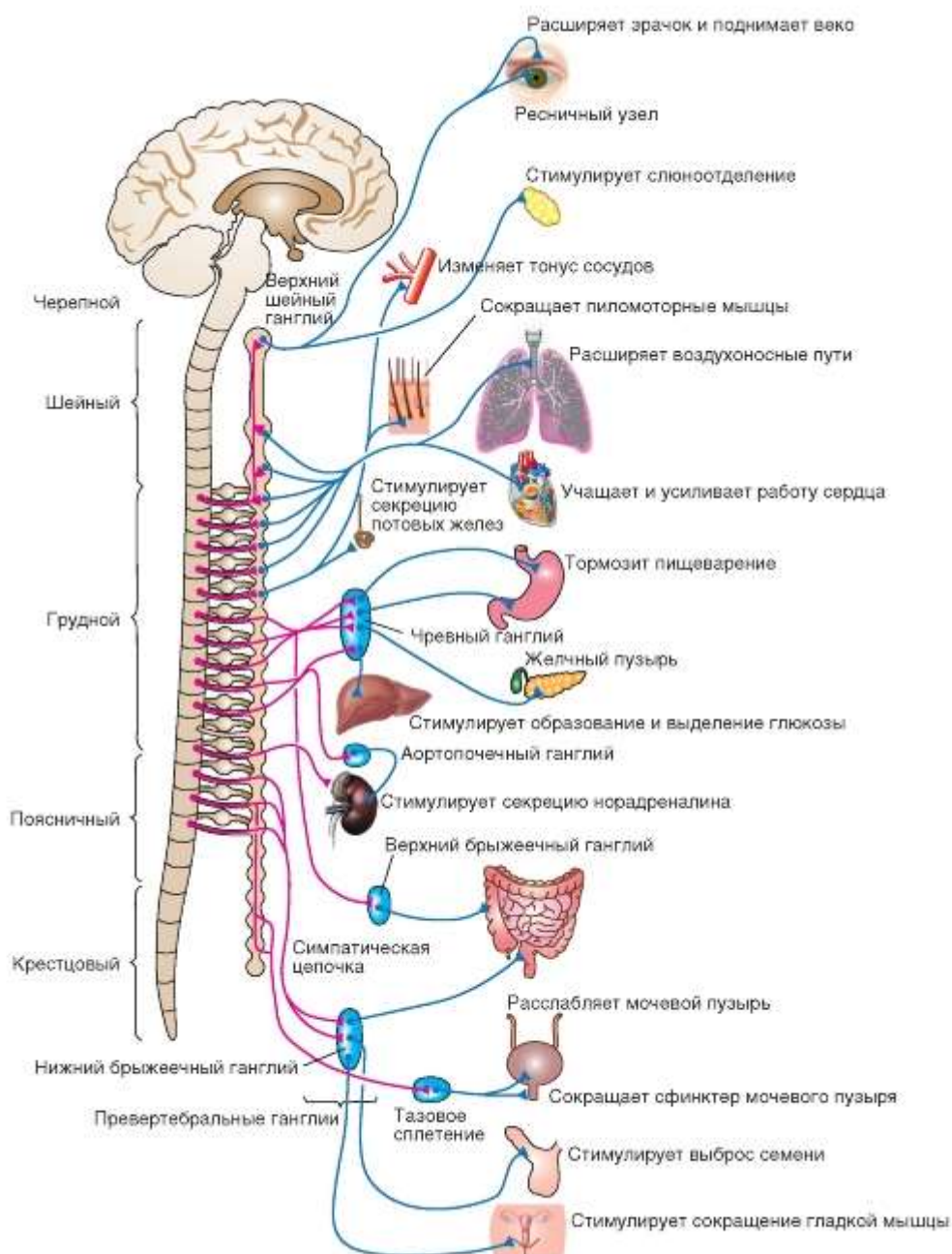
В составе внутренностного нерва преганглионарные аксоны часто идут к превертебральному ганглию, где образуют синапсы, либо они могут проходить через ганглий, оканчиваясь в более удаленном ганглии. Некоторые преганглионарные аксоны, идущие в составе внутренностного нерва, оканчиваются непосредственно на клетках мозгового вещества надпочечников.

Симпатическая цепочка тянется от шейного до копчикового уровня спинного мозга. Она выполняет функцию распределительной системы, позволяя преганглионарным нейронам, расположенным только в грудных и верхних поясничных сегментах, активировать постганглионарные нейроны, снабжающие все сегменты тела. Однако паравертебральных ганглиев меньше, чем спинальных сегментов, так как некоторые ганглии сливаются в процессе онтогенеза. Например, верхний шейный симпатический ганглий состоит из слившихся ганглиев С1-С4, средний шейный симпатический ганглий - из ганглиев С5-С6, а нижний шейный симпатический ганглий - из ганглиев С7-С8. Звездчатый ганглий образован слиянием нижнего шейного симпатического ганглия с ганглием Т1. Верхний шейный ганглий обеспечивает постганглионарную иннервацию головы и шеи, а средний шейный и звездчатый ганглии - сердца, легких и бронхов.

Обычно аксоны преганглионарных симпатических нейронов распределяются к ипсилатеральным ганглиям и, следовательно, регулируют вегетативные функции на той же стороне тела. Важное исключение - двусторонняя симпатическая иннервация кишечника и органов таза. Так же как двигательные нервы скелетных мышц, аксоны преганглионарных симпатических нейронов, относящиеся к определенным органам, иннервируют несколько сегментов. Так, преганглионарные симпатические нейроны, обеспечивающие симпатические функции областей головы и шеи, находятся в сегментах С8-Т5, а относящиеся к надпочечникам - в Т4-Т12.

Рис. 5-30. Вегетативная симпатическая нервная система.

А - основные принципы. Рефлекторную дугу см. на рис. 5-9 Б



Парасимпатический отдел вегетативная нервной системы

Преганглионарные парасимпатические нейроны лежат в стволе мозга в нескольких ядрах черепных нервов - в глазодвигательном ядре Вестфalia-Эдингера (III черепной нерв), верхнем (VII черепной нерв) и нижнем (IX черепной нерв) слюноотделительных ядрах, а также дорсальном ядре блуждающего нерва (*nucleus dorsalis nervi vagi*) и двойном ядре (*nucleus ambiguus*) X черепного нерва. Кроме того, такие нейроны есть в промежуточной области крестцовых сегментов S3-S4 спинного мозга. Постганглионарные парасимпатические нейроны находятся в ганглиях черепных нервов: в ресничном узле (*ganglion ciliare*), получающем преганглионарный вход от ядра Вестфalia-Эдингера; в крылонёбном узле (*ganglion pterygopalatinum*) и поднижнечелюстном узле (*ganglion submandibulare*) с входами от верхнего слюноотделительного ядра (*nucleus salivatorius*).

superior); в ушном узле(*ganglion oticum*) с входом от нижнего слюноотделительного ядра (*nucleus salivatorius inferior*). Цилиарный ганглий иннервирует мышцу-сфинктер зрачка и цилиарные мышцы глаза. От крылонёбного ганглия идут аксоны к слезным железам, а также к железам носовой и ротовой части глотки. Нейроны поднижнечелюстного ганглия проецируются к подчелюстной и подъязычной слюнным железам и железам ротовой полости. Ушной ганглий снабжает околоушную слюнную железу и ротовые железы (рис. 5-31 А).

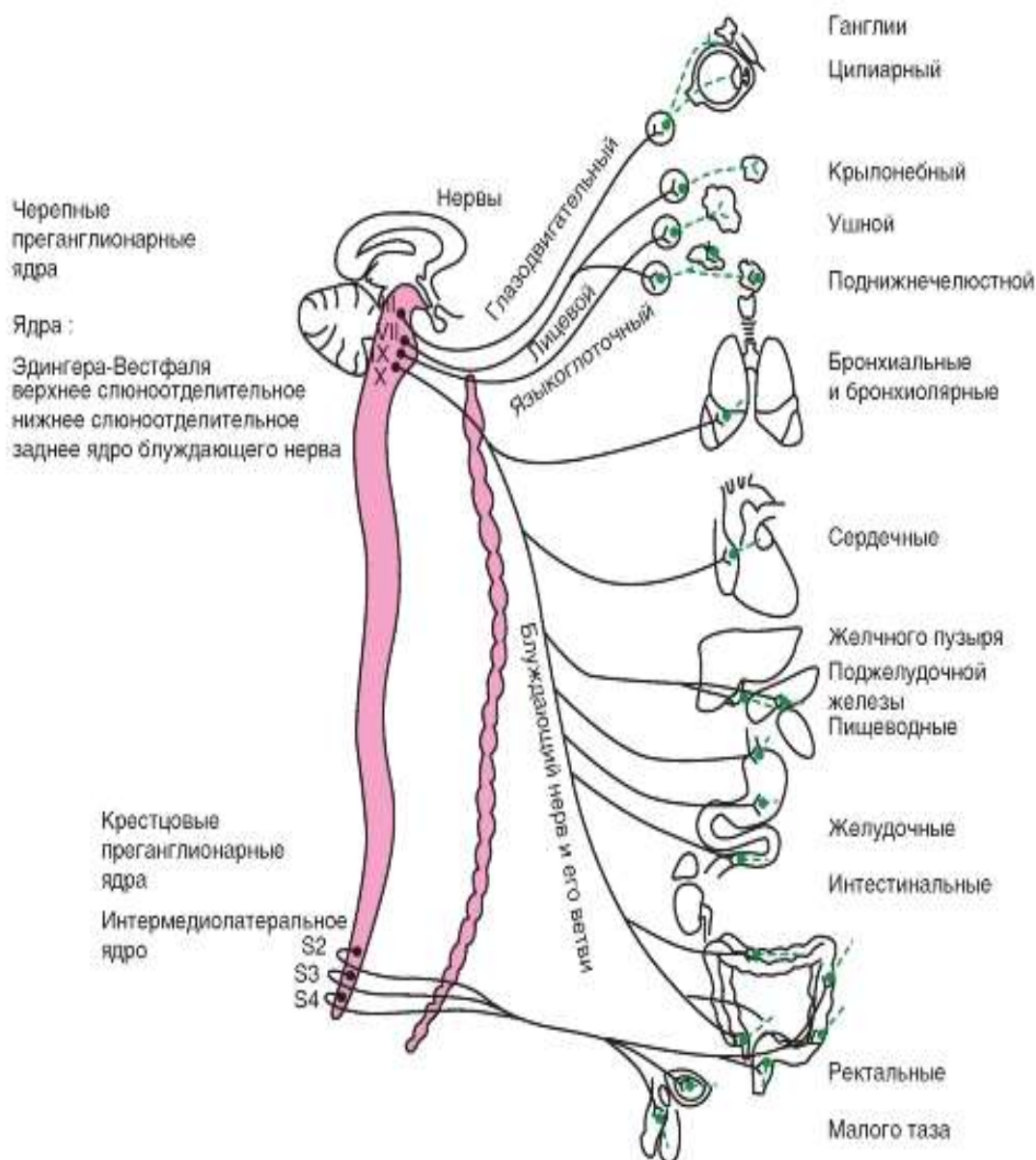
Другие постганглионарные парасимпатические нейроны расположены поблизости от внутренних органов грудной, брюшной и тазовой полости либо в стенках этих органов. Некоторые клетки энтерального сплетения тоже можно рассматривать как постганглионарные парасимпатические нейроны. Они получают входы от блуждающего или тазового нервов. Блуждающий нерв иннервирует сердце, легкие, бронхи, печень, поджелудочную железу и весь желудочно-кишечный тракт от пищевода до селезеночного изгиба толстой кишки. Остальная часть толстой кишки, прямая кишка, мочевого пузыря и половые органы снабжаются аксонами крестцовых преганглионарных парасимпатических нейронов; эти аксоны распределяются через посредство тазовых нервов к постганглионарным нейронам тазовых ганглиев.

Преганглионарные парасимпатические нейроны, дающие проекции к внутренним органам грудной полости и части брюшной, расположены в дорсальном двигательном ядре блуждающего нерва и в двойном ядре. Дорсальное двигательное ядро выполняет главным образом секретомоторную функцию (активирует железы), тогда как двойное ядро - висцеромоторную функцию (регулирует деятельность сердечной мышцы). Дорсальное двигательное ядро снабжает висцеральные органы шеи (глотку, гортань), грудной полости (трахею, бронхи, легкие, сердце, пищевод) и брюшной полости (значительную часть желудочно-кишечного тракта, печень, поджелудочную железу). Электрическое раздражение дорсального двигательного ядра вызывает секрецию кислоты в желудке, а также секрецию инсулина и глюкагона в поджелудочной железе. Хотя проекции к сердцу анатомически прослежены, их функции не ясны. В двойном ядре различают две группы нейронов:

- дорсальную группу, активирует поперечнополосатые мышцы мягкого нёба, глотки, гортани и пищевода;
- вентролатеральную группу, иннервирует сердце, замедляя его ритм.

Рис. 5-31. Вегетативная парасимпатическая нервная система.

А - основные принципы



Вегетативная нервная система

Вегетативную нервную систему можно рассматривать как часть двигательной (эфферентной) системы. Только вместо скелетных мышц эффекторами вегетативной нервной системы служат гладкая мускулатура, миокард и железы. Поскольку вегетативная нервная система обеспечивает эфферентное управление висцеральными органами, ее часто в зарубежной литературе называют висцеральной или автономной нервной системой.

Важный аспект деятельности вегетативной нервной системы - содействие в поддержании постоянства внутренней среды организма (гомеостаза). Когда от висцеральных органов поступают сигналы о необходимости отрегулировать внутреннюю среду, ЦНС и ее вегетативный эффекторный участок посылают соответствующие команды. Например, при внезапном повышении системного кровяного давления активируются барорецепторы, в результате чего вегетативная нервная система запускает компенсаторные процессы и восстанавливается нормальное давление.

Вегетативная нервная система участвует и в адекватных координированных реакциях на внешние стимулы. Так, она помогает регулировать величину зрачка в соответствии с освещенностью. Чрезвычайный случай вегетативной регуляции - ответ «борьба или бегство», возникающий при активировании симпатической нервной системы угрожающим стимулом. При этом включаются разнообразные реакции: высвобождение гормонов из надпочечников, повышение сердечного ритма и артериального давления, расширение бронхов, угнетение кишечной моторики и секреции, усиление метаболизма глюкозы, расширение зрачков, пилоэрекция, сужение кожных и висцеральных кровеносных сосудов, расширение сосудов скелетных мышц. Следует учесть, что ответ «борьба или бегство» нельзя считать рядовым, он выходит за рамки обычной деятельности симпатической нервной системы при нормальном существовании организма.

В периферических нервах вместе с вегетативными эфферентными волокнами следуют афферентные волокна от сенсорных рецепторов висцеральных органов. Сигналами от многих из этих рецепторов запускаются рефлексy, но активация некоторых рецепторов вызывает ощущения - боль, голод, жажду, тошноту, чувство наполнения внутренних органов. К висцеральной чувствительности можно еще отнести химическую чувствительность. Вегетативную нервную систему обычно подразделяют на симпатическую и парасимпатическую.

Функциональная единица симпатической и парасимпатической нервной системы - двухнейронный эфферентный путь, состоящий из преганглионарного нейрона с клеточным телом в ЦНС и постганглионарного нейрона с клеточным телом в автономном ганглии. В состав энтеральной нервной системы входят нейроны и нервные волокна миоэнтерального и подслизистого сплетений в стенке желудочно-кишечного тракта.

Симпатические преганглионарные нейроны находятся в грудном и верхнем поясничном сегментах спинного мозга, поэтому о симпатической нервной системе иногда говорят как о тораколюмбальном отделе автономной нервной системы. Иначе устроена парасимпатическая нервная система: ее преганглионарные нейроны лежат в стволе мозга и в крестцовом отделе спинного мозга, так что иногда ее называют краниосакральным отделом. Симпатические постганглионарные нейроны обычно расположены в паравертебральных или превертебральных ганглиях на расстоянии от органа-мишени. Что касается парасимпатических постганглионарных нейронов, то они находятся в парасимпатических ганглиях вблизи от исполнительного органа или непосредственно в его стенке.

Регулирующее влияние симпатической и парасимпатической нервной системы у многих организмов часто описывается как взаимно антагонистическое, однако это не совсем верно. Точнее будет рассматривать эти два отдела системы автономной регуляции висцеральных функций как действующие координированно: иногда - реципрокно, а иногда - синергично. Кроме того, не все висцеральные структуры получают иннервацию от обеих систем. Так, гладкие мышцы и кожные железы, а также большинство кровеносных сосудов иннервируются только симпатической системой; парасимпатическими нервами снабжаются немногие сосуды. Парасимпатическая система не иннервирует сосуды кожи и скелетных мышц, а снабжает лишь структуры головы, грудной и брюшной полости, а также малого таза.

Рис. 5-32. Вегетативная (автономная) нервная система (табл. 5-2)

Таблица 5-2. Реакции эффекторных органов на сигналы от вегетативных нервов *

Эффекторные органы	Типы рецепторов	Адренергические сигналы ¹ ; реакции ²	Холинергические сигналы ¹ ; реакции ²
Глаза	α	—	—
Радиальная мышца радужки	—	Сокращение (мидриаз) ++	—
Сфинктер радужки	—	—	Сокращение (миоз) +++
Цилиарная мышца	β	Расслабление при рассматривании удаленных предметов +	Сокращение при рассматривании близких предметов +++
Сердце:			
Синусно-предсердный узел	β_1	Увеличение частоты сокращений	Уменьшение частоты сокращений; паузная остановка +++
Предсердия	β_1	Повышение сократимости и скорости проведения	Снижение сократимости и (обычно) повышение скорости проведения + +
Атриовентрикулярный узел	β_1	Увеличение автоматизма и скорости проведения + + +	Уменьшение скорости проведения; атриовентрикулярный блок + + +
Проводящая система Гиса – Пуркинье	β_1	Увеличение автоматизма и скорости проведения + + +	Слабый эффект
Желудочки	β_1	Увеличение сократимости, автоматизма, скорости проведения, ритма идиовентрикулярных пейемекеров + + +	Слабое уменьшение сократимости
Артериолы:			
Коронарные	α, β_2	Сужение +; расширение ³ + +	Расширение + —
В коже и слизистой оболочке	α	Сужение + + +	Расширение ⁴
В скелетных мышцах	α, β_2	Сужение + +; расширение ^{3,5} + +	Расширение ⁶ +
Мозговые	α	Сужение (слабое)	Расширение ⁴
Легочные	α, β_2	Сужение +; расширение ³	Расширение ⁴
В органах брюшной полости; в почках	α, β_2	Сужение + + +; расширение ⁵ +	—
В слюнных железах	α	Сужение + + +	Расширение + +
Вены (системные)	α, β_2	Сужение + +; расширение + +	—
Легкие:			
Мышцы бронхов	β_2	Расслабление +	Сокращение + +
Железы бронхов	?	Ингибирование (?)	Стимуляция + + +
Желудок:			
Моторика и тонус	α_2, β_2	Снижение (обычно) ⁷ +	Усиление + + +
Сфинктеры	α	Сокращение (обычно) +	Расслабление (обычно) +
Секрция	—	Ингибирование (?)	Стимуляция + + +
Кишечник:			
Моторика и тонус	α_2, β_2	Снижение ⁷ +	Усиление + + +
Сфинктеры	α	Сокращение (обычно) +	Расслабление (обычно) +
Секрция	—	Ингибирование (?)	Стимуляция + +
Желчный пузырь и протоки	—	Расслабление +	Сокращение +

Окончание табл. 5-2.

Почки	β_2	Секреция ренина ++	—
Мочевой пузырь:			
Детрузор	β	Расслабление (обычно) +	Сокращение +++
Пузырный треугольник и сфинктер	α	Сокращение ++	Расслабление ++
Мочеточники:			
Моторика и тонус	α	Усиление (обычно)	Усиление (?)
Матка	α, β_2	Беременная: сокращение (α); небеременная: расслабление (β)	Эффект варьирует ⁸
Половые органы, мужские	α	Эякуляция +++	Эрекция +++
Кожа:			
Подомоторные мышцы	α	Сокращение ++	—
Потовые железы	α	Местная секреция ⁹ +	Генерализованная секреция +++
Капсула селезенки	α, β_2	Сокращение +++; расслабление +	—
Мозговое вещество надпочечников	—	—	Секреция адреналина и норадреналина
Печень	α, β_2	Гликогенолиз, глюконеогенез ¹⁰ +++	Синтез гликогена +
Поджелудочная железа:			
Ацинусы	α	Уменьшение секреции +	Секреция ++
Островки (β -клетки)	α	Уменьшение секреции +++	—
	β_2	Увеличение секреции +	—
Жировые клетки	α, β_1	Липолиз ¹⁰ +++	—
Слюнные железы	α	Секреция калция и воды +	Секреция калция и воды +++
	β	Секреция амилазы +	—
Слезные железы	—	—	Секреция +++
Железы подолотки	—	—	Секреция ++
Шиповидное тело	β	Синтез мелатонина	—

¹ Прочерк означает, что функциональная иннервация органа не обнаружена.

² Значки «+» (от одного до трех) указывают, насколько важна активность адренергических и холинергических нервов в регуляции конкретных органов и функций.

³ *In situ* преобладает расширение, обусловленное метаболической авторегуляцией.

⁴ Физиологическая роль холинергической вазодилатации в указанных органах спорна.

⁵ В диапазоне физиологических концентраций адреналина, циркулирующего в крови, у сосудов скелетной мускулатуры и печени преобладает опосредуемая β -рецепторами реакция расширения, а у сосудов других органов брюшной полости - реакция сужения, опосредуемая α -рецепторами. В сосудах почек и брыжейки есть, кроме того, специфические дофаминовые рецепторы, опосредующие расширение, которое, однако, не играет большой роли во многих физиологических реакциях.

⁶ Холинергическая симпатическая система вызывает вазодилатацию в скелетной мускулатуре, но этот эффект не участвует в большинстве физиологических реакций.

⁷ Существует предположение, что адренергическими нервами снабжаются тормозные β -рецепторы в гладких мышцах

и тормозные α -рецепторы на парасимпатических холинергических (возбуждающих) ганглионарных нейронах сплетения Ауэрбаха.

⁸ В зависимости от фазы менструального цикла, от концентрации в крови эстрогена и прогестерона, а также от других факторов.

⁹ Потовые железы ладоней и некоторых других областей тела («адренергическое потоотделение»).

¹⁰ Типы рецепторов, опосредующих определенные метаболические ответы, существенно варьируют у животных разных видов.